

TEKİRDAĞ' DA ZEYTİN DAL KANSERİ HASTALIĞI ETMENİ
***Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin TANISI VE BAKTERİYEL**
ANTAGONİSTLERLE BİYOLOJİK MÜCADELESİ

Ece SANCAR

Yüksek Lisans Tezi

Bitki Koruma Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

2018

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEKİRDAĞ' DA ZEYTİN DAL KANSERİ HASTALIĞI ETMENİ
Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi' nin **TANISI VE BAKTERİYEL**
ANTAGONİSTLERLE BİYOLOJİK MÜCADELESİ

Ece SANCAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Tekirdağ 2018

Her hakkı saklıdır.

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.03.YL.17.112 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında, Ece SANCAR tarafından hazırlanan “**Tekirdağ’ da Zeytin Dal Kanseri Hastalığı Etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ nin Tanısı ve Bakteriyel Antagonistlerle Biyolojik Mücadelesi**” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof.Dr. Mustafa MİRİK

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Adnan KARA

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KÜSEK

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TEKİRDAĞ' DA ZEYTİN DAL KANSERİ HASTALIĞI ETMENİ *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *SAVASTANOI*' NİN TANISI VE BAKTERİYEL ANTAGONİSTLERLE BİYOLOJİK MÜCADELESİ

Ece SANCAR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Zeytin (*Olea europaea*) ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (syn. *P. syringae* pv. *savastanoi*)' nin neden olduğu zeytin dal kanseri yaralar yoluyla giriş yaparak zeytin ağaçlarını enfekte etmektedir. Bakteri tarafından üretilen ve enfeksiyonu çevreleyen hücrelerin çoğalmasına neden olan fitohormonlar bu hastalığa özgü tipik gal oluşumuna neden olmaktadır. Bu çalışma 2015-2017 yılları arasında Tekirdağ ilinde gerçekleştirilmiştir. Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin tanısı ve yaygınlığının tespit edilmesi için farklı zeytin çeşitlerinden 78 adet hastalıklı bitki örneği toplanmış ve 52 adet izolat klasik tanı yöntemleriyle tanılanmıştır. Tanılanan tüm bakteri izolatları, patojenite testi yapılan zeytin fidanlarında ur oluşumuna neden olmuş ve King's B besi ortamında zayıf floresan pigment üretmiştir. İzolatların tamamı gram negatif olurken oksidaz, pektolitik aktivite, levan ve arginin dehidrolaz negatif, tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonları ile LOPAT 1B grubunda yer aldığı belirlenmiştir. Bundan dolayı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak tanılanmıştır. Ayrıca, yapılan çalışmalarla zeytin dal kanseri hastalığının Tekirdağ ilinde yaygınlığı %33 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Zeytin bahçelerinden, zeytin ağaçlarından toplanan çiçek ve yapraklarından 50 adet, topraktan 60 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatların tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonları negatif olarak belirlenmiştir. Labarotuar

koşullarında yapılan patojen ile ikili kültür denemeleri sonucunda 110 izolatın arasında 23 tanesi 1-10.8 mm arasında inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, zeytin dal kanseri, zeytin, LOPAT, tanı

2018, 52 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

IDENTIFICATION OF BACTERIAL KNOT DISEASE AGENT *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *SAVASTANOI* AND BIOLOGICAL CONTROL OF DISEASE BY ANTAGONISTIC BACTERIA IN TEKİRDAĞ

Ece SANCAR

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Olive knot disease on olives (*Olea europaea*) is caused by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (syn. *P. syringae* pv. *savastanoi*) which infects through wounds. The galling typical of this disease is caused by phytohormones produced by the bacteria, which cause proliferation of cells surrounding the infection. This study was conducted in 2015- 2017 in several provinces of Tekirdağ in Trakya region. To investigate the identification and prevalence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, totaly 78 infected knot samples collected from several olive cultivars and 52 isolates of bacterium were detected at classical characterization tests. All of the isolates were gram negative and were found to be in the LOPAT 1B group with oxidase, pectolytic activity, levan and arginine dihydrolase negative, hypersensitivity reactions in tobacco leaves. It has therefore been identified as *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In addition, it has been determined that the prevalence of olive branch cancer disease in the province of Tekirdağ is 33%. From olive gardens, 50 pieces of flowers and leaves collected from olive trees and 60 pieces of isolates were obtained from soil. The hypersensitivity reactions of these isolates to tobacco leaves were negative. As a result of double-culture experiments with pathogen in laboratory conditions, among the 110 isolates, 23 of them produced an inhibition zone of 1-10.8 mm.

Key Words: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, olive knot disease, olive, LOPAT, identification

2018, 52 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	9
2.1. İsimlendirmesi ve Tanısı	9
2.2. Konukçuları	10
2.3. Türkiye ve Dünyadaki Durumu	10
2.4. Mücadele	12
3. MATERYAL-METOD	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Metod.....	15
3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	15
3.2.2. İzolasyon Çalışmaları	16
3.2.2.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> İzolasyonu	16
3.2.2.2. Zeytin Çiçek ve Yapraklarından Aday Antagonist İzolasyonu	17
3.2.2.3. Toprakdan Aday Antagonist İzolasyonu	18
3.2.2.4. Fosfat Çözme Özelliklerinin Belirlenmesi.....	18
3.2.3. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi	19
3.2.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> Tanılama Çalışmaları	19
3.2.4.1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testleri.....	19
3.2.4.2. Levan Oluşumu	19
3.2.4.3. Oksidaz Testi	20
3.2.4.4. Pektolitik Aktivite Testi.....	20

3.2.4.5. Arginin Dihidrolase Testi	20
3.2.4.6. Tütün' de Aşırı Duyarlılık Testi (Hipersensitif Reaksiyon: HR)	21
3.2.5. Zeytin Çiçek ve Yapraklarının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ' nin Gelişimine Antagonistik Etkisi	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	22
4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	22
4.2. İzolasyon Çalışmaları	22
4.2.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> İzolasyonu	24
4.2.2. Zeytin Çiçek ve Yapraklarından Aday Antagonist İzolasyonu	25
4.2.3. Topraktan Aday Antagonist İzolasyonu	25
4.2.4. Fosfat Çözme Özelliklerinin Belirlenmesi	26
4.3. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi	26
4.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> Tanı Testleri	27
4.4.1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi	27
4.4.2. Levan Oluşumu	28
4.4.3. Oksidaz Testi	28
4.4.4. Pektolitik Aktivite Testi	29
4.4.5. Arginin Dihidrolase Testi	30
4.4.6. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi	30
4.5. Zeytin Çiçek ve Yaprakların <i>In vitro</i> Koşullarda <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ' nin Gelişimine Antimikrobiyal Etkisi.....	34
4.6. Aday Antagonistlerin Besi Ortamında Etkinlikleri	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
TEŞEKKÜR.....	44
KAYNAKLAR.....	45
EKLER	50
ÖZGEÇMİŞ	52

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. 1. Dünya sofralık zeytin üretimleri (bin ton). (FAO 2016).....	2
Çizelge 1. 2. Dünya zeytinyağı üretimleri (bin ton). (IOC 2016).....	2
Çizelge 1. 3. Türkiye’ de zeytin ağacı sayısı ve zeytin üretiminin yıllara göre durumu.....	3
Çizelge 1. 4. Tekirdağ ili zeytin üretim miktarları (TÜİK 2015).....	4
Çizelge 4. 1. Tekirdağ’da bulunan zeytin bahçelerindeki toplanan örnek sayıları.....	23
Çizelge 4. 2. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatlarının klasik test sonuçları.....	32
Çizelge 4. 3. Lopat test sonuçları.....	34
Çizelge 4. 4. Aday bakteriyel antagonistlerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm).....	36

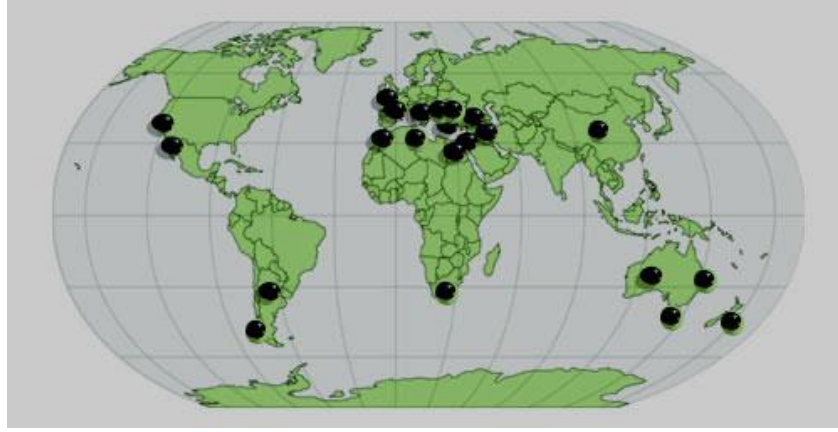
Şekil 1. 1. Dünya zeytin üretim alanları (Anonim 2009)	1
Şekil 1. 2. Türkiye zeytin üretim alanları (TÜSSİDE 2015).....	1
Şekil 1. 3. Zeytin üzerinde görülen <i>pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ' nin neden olduğu ur belirtisi.....	6
Şekil 3. 1. Zeytin <i>pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ur belirtisi ve urlardan izolasyon.	17
Şekil 3. 2. Zeytin çiçek ve yapraklarından aday antagonist izolasyonu.....	18
Şekil 4. 1. Tekirdağ İli Şarköy ilçesi survey yapılan mahalleler	22
Şekil 4. 2. Hoşköy'de zeytin bahçesi hastalıklı bitki örneklerinin incelenmesi.....	23
Şekil 4. 3. Mürefte'de hastalıklı bitki örneklerinin incelenmesi.....	24
Şekil 4. 4. Zeytin yaprak ve çiçeğinden elde edilen aday antagonist bakteri izolatları.....	25
Şekil 4. 5. Zeytin fidanlarında patojenite testi.....	26
Şekil 4. 6. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatları yapılan koh testi sonucunda öze yapışarak oluşturduğu sümüksü yapı.....	27
Şekil 4. 7. Levan oluşumu.....	28
Şekil 4. 8. Oksidaz testi sonucu oluşan renk değişimi.....	29
Şekil 4. 9. Pektolitik aktivite testi negatif ve pozitif sonucu.....	29
Şekil 4. 10. Arginin dihidrolase testi.....	30
Şekil 4. 11. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatının tütün yaprak damar aralarında oluşturduğu tipik aşırı duyarlılık reaksiyonu (hipersensitive reaksiyon HR)	31
Şekil 4. 12. Patojenin ml' deki hücre sayısının belirlenmesi.....	35
Şekil 4. 13. Aday antagonistlere karşı <i>pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> patojeninin yüzeye püskürtülmesi.....	35
Şekil 4. 14. Farklı aday bakteriyel antagonistlerin <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

g	: Gram
lt	: Litre
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
HCl	: Hidroklorik asit
HR	: Hypersensitive reaction (Aşırı duyarlılık reaksiyonu)
KOH	: Potasyum hidroksit
NBRIP	: National Botanical Research Institute's phosphate growth medium
pv	: pathovar
spp.	: species (türler)
YDCA	: Yeast extract kalsium karbonat agar.

1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea*), zeytingiller (*Oleaceae*) familyasından meyvesi yenen Akdeniz iklimine özgü bir ağaç türüdür. Zeytin, dünya üzerinde Türkiye'nin de içinde bulunduğu orta kuşakta ve Akdeniz ikliminin etkili olduğu yerlerde doğal olarak yetişir (Gemaz ve ark. 2004).



Şekil 1. 1. Dünya zeytin üretim alanları (Anonim 2009).

Meyvesinden sofralık zeytin ve zeytinyağı olarak faydalanılırken yapraklarından da ilaç sanayisinde faydalanılmaktadır (Özkaya ve ark. 2010).

Zeytin, Türkiye tarım ekonomisinde önemli ilk 10 üründen bir tanesidir. Zeytin, üreticilerimizin yaklaşık %10'u tarafından yetiştirilmekte ve önemli bir gelir kaynağını teşkil etmektedir (Akay 1996). Şekil 1. 2.'de Türkiye'de zeytin yetiştirilen alanlar görülmektedir.



Şekil 1. 2. Türkiye zeytin üretim alanları (TÜSSİDE 2015).

Çizelgede 1. 1.'de görüldüğü üzere FAO 2016 verilerine göre tane zeytin üretiminde 1.sırada İspanya yer almakta, bunu İtalya ve Yunanistan izlemektedir. Zeytin üretiminde Türkiye ise dünya genelinde 4. sırada yer almaktadır.

Çizelge 1. 1. Dünya sofralık zeytin üretimleri (bin ton).(FAO 2016).

	2014	2013	2012	2011
İspanya	4.578	9.250	3.849	7.820
İtalya	1.964	2.941	3.018	3.182
Yunanistan	2.284	1.918	2.825	1.874
Türkiye	1.754	1.676	1.820	1.750

Devlet İstatistikleri Enstitüsü araştırmalarına göre, Türkiye’de üretilen zeytinlerin % 68’i yağ üretimine ve % 32’si sofrada kullanılmak üzere yetiştirilmektedir.

Bunun yanında zeytin yağ sektöründe ise Türkiye yıllara göre değişikliklerle birlikte Çizelge 1. 2.’ de görüldüğü üzere dünyada ilk 6 içerisinde yer almaktadır. Türkiye’de önemli bir zeytinyağı üreticisi ülke olarak İspanya, İtalya, Yunanistan ve Tunus gibi ülkelerle birlikte zeytinyağı dış ticaretinde ön plana çıkmaktadır (Armağan ve ark. 2006).

Çizelge 1. 2. Dünya zeytinyağı üretimleri (bin ton). (IOC 2016).

	2015/16	2014/15	2013/14	2012/13
İspanya	1.300	842	1.781.5	618.2
İtalya	350	222	463,7	415.5
Yunanistan	300	300	132	357.9
Tunus	140	340	70	220
Suriye	215	105	180	175
Türkiye	143	170	135	195

Türkiye'de 845.542 hektar alanda 173 milyon zeytin ağacı bulunmakta ve her geçen yıl da bu rakam artmaktadır (Çizelge 1. 3.). Son yirmi yılda zeytin ağacı adedinde ikibuçuk misli artış olmuştur. Fakat meyve veren zeytin ağacı sayısı artarken, üretimde buna paralel bir artış son yıllarda görülmemiştir (TÜİK 2015). İllere göre en çok zeytin ağacı İzmir, Aydın, Muğla, Balıkesir, Bursa, Gaziantep, Çanakkale, Hatay, Manisa, Antalya ve İçel olarak sıralanmaktadır.

Çizelge 1. 3. Türkiye' de zeytin ağacı sayısı ve zeytin üretiminin yıllara göre durumu

Yıllar	Meyve Veren Ağaç Sayısı (Adet)	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı (Adet)	Üretim (Ton)
2015	144.760.000	27.232.000	1.700.000
2014	140.712.000	28.285.000	1.768.000
2013	129.161.000	37.869.000	1.676.000
2012	120.821.000	36.240.000	1.820.000
2011	117.942.000	36.669.000	1.750.000

Tekirdağ' da zeytin üretim alanında son yıllarda bir artış gözlenmezken elde edilen ürün miktarında ise bir artış görülmektedir (Çizelge 1. 4.).

Çizelge 1. 4. Tekirdağ ili zeytin üretim miktarları (TÜİK 2015).

Yıllar	Alan (Dekar)	Üretim (Ton)
2015	4.200	1.390
2014	4.200	590
2013	4.234	1.140
2012	4.200	4.200
2011	4.212	1.273

Son yıllarda, nüfusun artışı ile sağlıklı beslenme bilinci ve yerel ürünlerin tüketim eğiliminin artması sonucu dünyada sofralık zeytin ve zeytinyağı tüketimi artış göstermiştir. Dünya talebinin artması, üretici ülkelerde sofralık zeytin ve zeytinyağı üretim ve dış ticaretinde önemli gelişmelerin yaşanmasına yol açmıştır (Seçer ve Emeksiz 2012).

Bu kadar yoğun bir öneme sahip olan zeytin üretim alanlarında birçok hastalık nedeniyle kayıplar olmaktadır. Bu hastalıklar içerisinde fungal etmenlerden kaynaklanan Halkalı Leke Hastalığı (*Spilocaea oleagina* (Cast) Hugines)'nın zeytin yetiştirilen alanlarda önemli kayıplara yol açabildiği belirtilmiştir (Tezcan, 2000). Fidanlıklarda ağırlıklı olarak *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. ve *Alternaria* spp.'nin görüldüğü belirtilmektedir (Yıldız ve Arslan 1988). Tüm zeytinliklerdeki ağaçlarda değişik düzeylerde dal kurumalarına veya tamamen kuruma sonucu ölümlere neden olan *Verticillium Solgunluğu* (*Verticillium dahliae* Kleb.)'nun da önemi artmaktadır (Yolageldi ve ark. 2001).

Bunun yanında Zeytin dal kanseri hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) gibi önemli bakteri hastalığı da bulunmaktadır (Iacobellis 2001). Gelişmekte olan dallar ve bazen yaprakların üzerinde bulunan urlarla karakterize edilen zeytin dal kanseri hastalığı, ilk olarak M.Ö. 4. yüzyılda Yunan felsefeci Teophrastus tarafından açıklanmıştır (Young 2004).

Hastalığa neden olan etmen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* düz çubuk şeklinde, bir veya iki kamçıya sahip gram negatif bir bakteridir. Bakterinin eni 0.5-1 µm, boyu 1.5-4.0 µm arasında değişmektedir (Palleroni, 1989). Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin, zeytin (*Olea europaea* L.)'in yanı sıra zakkum (*Nerium oleander*), leylak (*Syringae* spp.), akçakesme (*Phillyrea* spp.), dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.), kurtbağrı (*Ligustrum japonicum*), yasemin (*Jasminum* spp.), çan çiçeği (*Forsythia* spp.) (Iacobellis ve ark. 1993; Azad ve ark. 1995) , mersin (*Myrtus* spp.) ve cılbırtı çalısında (*Fontanesia phillyreoides*) (Mirik ve ark. 2011) konukçuluk ettiğini saptamışlardır.

Yapılan diğer çalışmalarda etmenin yeni konukçuları olarak Akdiken (*Rhamnus alaternus*) (Temsah ve ark. 2007), Çin ardıcı (*Loropetalum chinense*) (Conner ve ark. 2013) ve nar (*Punica granatum* L.) bitkisinin *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin yeni bir konukçusu olduğu saptamıştır.

Zeytin dal kanseri etmeni bakteri ilk olarak zeytin bitkisinden Smith tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* olarak isimlendirilmiştir (Janse 1982). Önceki yıllarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, biyokimyasal ve fizyolojideki benzerlikleri nedeniyle *Pseudomonas syringae*' nin pathovarından biri olarak düşünülmüştür. DNA-DNA hibridizasyon verileri, *Pseudomonas savastanoi*' nin aslında *Pseudomonas syringae*' den genetik farklılığa sahip olduğunu ortaya koymuştur. *Pseudomonas savastanoi* ve *Pseudomonas syringae* pathovarları, LOPAT karakteri (oksidaz, pektolitik ve arginin dehidrolaz aktivitesi, tütün aşırı duyarlılığı) açısından benzer sonuçlar göstermiştir. *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*' nin genel özelliklerine sahip olmakla birlikte, her zaman tipik bir levan-negatif bakteri olarak düşünülmüştür (Bradbury 1986). Daha sonraki yıllarda Sisto ve ark. (1999)'nın bildirdiğine göre Gardan ve ark. 1992 yılında yaptıkları bir taksonomik çalışmayla bakteri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak adlandırılmıştır.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*' yi tanılama teknikleri içerisinde bakteriyel izolasyonlar, sonrasında yapılan patojenite testleri ve biyokimyasal testler yer almaktadır. Tanıyı desteklemek için serolojik testler (Casano ve ark. 1987), moleküler yöntemler (Penyalver ve ark. 2000, Ersoy 2002) kullanılmaktadır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin izolasyonunda yaygın olarak yarı seçici besi yeri kullanımı diğer bakterilerle karışık olduğu durumlarda kolaylık sağlamaktadır. Yoğun olarak gram negatif bakterilerin bulunduğu durumlarda PVF1 yarı seçici besi yeri (Surico ve Lavermicocca 1989) kullanılmaktadır. PVF1 yarı seçici besi ortamında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin UV ışığı altında flouresan ışık verme özelliği ile ayırt edilebilecekleri bildirilmiştir (Surico ve

Lavermicocca 1989). Bunun yanında saprofitik bakterilerin gelişimini % 89-97 oranında engelleyebilen OKA isimli bir yarı seçici besi ortamı geliştirildiği gözlenmiştir (Azad ve Cooksey 1995).



Şekil 1. 3. Zeytin üzerinde görülen *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin neden olduğu ur belirtisi

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*' nin neden olduğu ur gelişimi, indol asetik asit ve sitokinin fitohormonlarının bakteri tarafından üretiminin teşvik edilmesine bağlıdır (Comai ve Kosuge 1980, Iacobellis ve ark. 1994, Rodríguez-Moreno ve ark. 2008, Smidt ve Kosuge 1978, Suricove ark. 1985). Ur gelişimine *hrp / hrc* genleri de etki etmektedir (Sistove ark. 2004). Uurlar genellikle, aktif büyüme periyodu olan ilkbaharda oluşmaktadır (Young 2004). Etmenin bitki dokusuna girebilmesi için dokuların yaralanması gerekmektedir (Surico, 1986). Enfeksiyon için giriş yeri olan yaralar; budama, don ve dolu gibi olaylardan kaynaklanmaktadır. Hastalık etmeni bir kez bu yaralar ve çatlaklardan giriş yaptığında hızla bitki dokusu içerisinde ilerlemektedir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* enfeksiyonları sıklıkla gövde ve dallarda görülürken; yapraklarda ve meyvelerde ise nadir bulunmaktadır (Smith 1978) (Şekil 1.3.).

Hastalık gelişiminde sıcaklık sınırlayıcı bir etken değildir. Patojenin gelişmesi için optimum 22-24°C, minimum 5-10°C, maksimum 32°C sıcaklık gereklidir. Doğal enfeksiyonların çoğu Ekim ile Haziran ayları arasında yağmurlu dönemlerde meydana gelmektedir. Uurlar ise ağaçların aktif büyüme periyodu olan ilkbaharda oluşmaktadır (Young 2004). Bu nedenle sonbahar sonunda meydana gelen enfeksiyonlar bahara kadar fark edilmemektedir. Ancak ilkbahardaki enfeksiyonlardan 10-14 gün sonra uurların belirgin hale geldiği saptanmıştır (Teviotdale 1994).

Zeytin dal kanseri hastalığı küresel bir sorundur ve Avrupa, Asya, Afrika, Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Avustralya'nın bazı bölgelerinde görülmüştür. Virülensliğin görülme sıklığı ve derecesi coğrafyaya göre değişmektedir (Young 2004).

Zeytin dal kanseri, zeytin yetiştirilen her yerde görülen endemik bir hastalıktır. Ülkemizde hastalık Karadeniz, Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde bulunmaktadır (Basım ve Ersoy 2000, Tatlı ve Benlioğlu 2004, Mirik ve ark. 2004). Tekirdağ ilinde erken ilkbahar donları olduğu bilinmektedir ve bu donlar zeytin ağaçlarında bakteriyel etmenin girişini kolaylaştıran dolu yaraları ve don çatlaklarına neden olabilmektedir.

Etmenle mücadele edilmediği takdirde yıldan yıla artış göstererek zeytinin kalite ve miktarının düşmesine neden olmakta ve böylece önemli derecede ekonomik ürün kayıplarına yol açmaktadır (Wilson 1935, Schroth ve ark. 1968, Schroth ve ark. 1973, Quesada ve ark. 2010).

Hastalık ile mücadele kültürel önlemler ve bakırlı preparatlarla yapılmaktadır. Fakat etmen bir yara patojeni olduğu için yapılan mücadele yeterli olamamaktadır. Dayanıklı zeytin çeşitleri nadirdir, ancak bitkilerin *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Genç zeytin bitkileri özellikle enfeksiyona karşı dayanıklıdır

(Penyalver ve ark. 2006). Zeytin dal kanseri hastalığının kontrolü, konukçu aralığı içindeki patojenler nedeniyle zordur (Lavermicocca ve ark. 2002).

Zeytin dal kanseri gibi bitki bakteri hastalıklarıyla mücadelede etkin bir bakterisit olmaması ve kimyasal mücadelenin yetersiz kalması bizi biyolojik mücadele çalışmalarına yönlendirmektedir. Son yıllarda biyopreparat üretim çalışmaları, en etkili antagonistlerin kitlesel üretimi, en uygun formülasyonların geliştirilmesi, bu antagonistlerin hedef patojenlere *in vitro* ve *in vivo* etkililik düzeyleri gibi çalışmalara biyolojik mücadele araştırmaları yapan uluslararası kuruluşlar tarafından her zamankinden daha çok kaynak ayrılmaktadır.

Antagonist bakteri izolatları kullanılarak, bitki bakteri hastalıklarının kontrolüne yönelik yapılan biyolojik mücadele çalışmaları bitki bakteri hastalıklarının tarımsal mücadelesinde önemli değişimlerin olacağını gösteren ön çalışmalardır.

Bu çalışma ülkemiz zeytinciliğinde yeri olan Tekirdağ ilindeki zeytin bahçelerini *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* açısından incelemek ve etmeni tanılamak, hastalığın Tekirdağ ilinde zeytin bahçelerindeki yaygınlık oranını saptamak, etmene karşı *in-vitro* koşullarda bakteriyel antagonistler ile biyolojik mücadelede başarısını ortaya koymak amacıyla ele alınmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. İsimlendirmesi ve Tanısı

Zeytin dal kanseri hastalığı, ilk olarak M.Ö. 4. yüzyılda Yunan Felsefecisi Teophrastus tarafından açıklanmıştır (Young, 2004).

Bakteri ilk olarak *Olea europea* L. (zeytin) bitkisinden Smith tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* olarak isimlendirilmiştir. Sonrasında 1932 yılında dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) bitkisinden Brown tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* var. *fraxini* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Janse 1982).

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*, biyokimyasal ve fizyolojideki benzerlikleri nedeniyle *Pseudomonas syringae*' nin pathovarından biri olarak düşünülmüştür. DNA-DNA hibridizasyon verileri, *Pseudomonas savastanoi*' nin aslında *Pseudomonas syringae*' den genetik olarak farklı olduğu ortaya koymuştur. *Pseudomonas savastanoi* ve *Pseudomonas syringae* pathovarları, LOPAT karakteri (oksidaz, pektolitik ve arginin dehidrolaz aktivitesi, tütün aşırı duyarlılığı) açısından benzer sonuçlar göstermiştir. *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*' nin genel özelliklerine sahip olmakla birlikte, her zaman tipik bir levan-negatif bakteri olarak düşünülmüştür (Bradbury, 1986). *Pseudomonas savastanoi*' yi de içeren birkaç pathovarı daha sonra *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak adlandırılmıştır (Gardan ve ark. 1992).

Nerium oleander L. bitkisinde bu hastalık etmeninin ilk kez tanılanması Ferraris tarafından 1926' da *Pseudomonas tonelliana* olarak yapılmış ancak 1928'de Smith tarafından daha kesin bir tanılama yapılarak *Pseudomonas savastanoi* subsp. *nerii* olarak isimlendirilmiştir. Sonraki yıllarda Sisto ve ark. (1999)' nin bildiklerine göre Gardan ve ark. 1992 yılında yaptıkları bir taksonomik çalışmayla bakteriyi *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak adlandırmışlardır (Janse 1982).

Mirik ve Aysan (2011), Marmara Bölgesinde Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bursa ve Yalova illerinde yaptıkları çalışmalarda zeytin üretim alanlarından elde ettikleri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarını klasik, BİOLOG, yağ asit analizleri ve spesifik PCR yöntemlerini kullanarak izolatların tanımlarını yapmışlardır.

2.2. Konukçuları

Zeytin bitkisinde dal kanserine neden olan etmenin konukçuları olarak Zeytin (*Olea europea* L.) (Smith 1908, Young ve ark. 1978), Zakkum (*Nerium oleander*), Yasemin (*Jasminium officinale* L.) (Janse 1981), Dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) (Janse 1981) ve Forzitya (*Forsythia* sp.) (Iacobellis ve ark.1998) ve Nar (*Punica granatum* L.) (Bozkurt ve ark. 2014) saptanmıştır.

Mirik ve ark. (2011) zeytin, zakkum, yasemin, mersin ve cılbırtı çalışından elde ettikleri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarını konukçuların tamamında yaptıkları patojenite çalışmalarında farklılıkların olduğunu belirlemişlerdir. Zeytinden elde edilen izolatlar zakkumda, zakkumdan elde edilen izolatlar yaseminde, yaseminden elde edilen izolatlar ise zakkum bitkisinde ur oluşumuna neden olmazken diğer konukçularda ur oluşumuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının izole edildikleri konukçularına verildiğinde daha şiddetli ur oluşumlarına neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

2.3. Türkiye ve Dünyadaki Durumu

Hall ve ark. (2004), yaptıkları çalışma ile zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin varlığını zeytin ağaçlarında (cv. Barnea) belirlemişlerdir. Etmen, zeytin dal kanseri hastalığının tipik simptomlarını gösteren iki yaşındaki zeytin ağaçlarından Güney Avustralya' nın Adelaide bölgesinden izole etmişlerdir. Güney Avustralya' nın diğer bölgelerinden de 2-5 yaş arasındaki fidanlardan hastalık etmenini izole etmişlerdir. Bu çalışma zeytin dal kanseri hastalığının Avustralya' daki ilk raporunu yapmışlardır.

Servi ve Baştaş (2006, 2007) yıllarında yaptıkları araştırmada Aydın İlindeki sekiz ilçede (Söke, Koçarlı, Çine, Nazilli, Karacasu, Bozdoğan, Buharkent, Kuyucak) zeytin bakteriyel dal kanseri Hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)' nın tespiti ve tanılanması üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada Aydın ilinde, zeytin ağaçlarından alınan 85 örnekten bakteriyel dal kanserini izole etmişler ve il genelinden toplanan örneklerde etmenin yaygınlık oranı %44,9 olarak belirlemişlerdir.

Quesada ve ark. (2007), doğal yollarla *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ile enfekte olmuş zeytin ağaçlarında, sürgün ve yapraklardan elde ettikleri izolatlar ile hastalığın

İspanya’ da mevsimsel hareketlerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada yapraklar ve sürgünlerden elde edilen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları arasında sayıca önemli bir farklılık olmadığını ortaya koymuşlardır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* etmeninin izolasyon sıklığı ve popülasyon ortalamalarında araziler arasında farklılıklar olduğu belirlemişlerdir. Bitki materyali veya arazide *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonları ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olmayan bakteriler arasında herhangi bir korelasyon gözlememişlerdir. Bununla birlikte, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ve sarı renkli *Pantoea aglomerans* kolonileri arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. Çalışmanın yapıldığı üç yıllık süre boyunca *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* etmeninin popülasyon değişimi, yaz mevsimi ve yılın geri kalan mevsimlerinde önemli farklılıklar göstermiştir. En yüksek popülasyon yılın ılık ve yağışlı aylarında gerçekleşirken, düşük popülasyonlar genellikle sıcak ve kuru aylarda olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mirik ve ark. (2007), Marmara Bölgesinde Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Tekirdağ ve Yalova illerindeki zeytin üretim alanlarında survey yapılarak dal kanseri hastalığının yaygınlığını araştırmışlardır. Hastalığın üretim alanlarında yaygınlığı % 15-100 arasında değişmekle birlikte ortalama % 57 olarak belirtmişlerdir. İllere göre hastalığın yaygınlık oranı; Balıkesir % 56, Çanakkale % 73, Tekirdağ % 30 olarak saptamışlardır. Sofralık Gemlik çeşidinin üretildiği Bursa ve Yalova’ da hastalığa rastlamamışlardır. Yağlık çeşitlerin üretildiği Mudanya’ da ise hastalık % 2-5 arasında değişen oranlarda belirlemişlerdir.

Perez-Martinez ve ark. (2008), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ nin neden olduğu zeytin dal kanseri Akdeniz de görülen ciddi bir hastalık olduğu belirtilmiştir. Karakteristik simptomlar indol-3-asetik (IAA), sitokininler ve hrp/hrc genlerinin dahil olduğu üzere bakterinin ürettiği faktörlere bir reaksiyon olarak gelişen urlardan oluştuğunu açıklamışlardır.

Mirik ve Aysan (2008), çalışmalarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ nin neden olduğu urlardan yapılan izolasyon PSF besi yeri bulunan petrilere üç çizgi ekim yöntemi ile çizilmiş ve 48 saat 25 °C’de inkübe edildikten sonra bir gün buzdolabında bekletmişlerdir. Bu sayede petri içerisinde gelişen ve ortamın yüzeyini kaplayan sarı saprofitik bakteri gelişimi engellenerek patojenin izolasyonunu kolaylaştırdığını bildirmişlerdir.

Marchi ve ark. (2009), tarafından yapılan incelemelerde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* zeytin ağaçlarında epifit ve endofit olarak ksilemde belirli bir dereceye kadar hayatta kaldıklarını bildirmişlerdir. Epifitik olarak görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

mevsimsel dalgalanmalar gösterdiğini belirlemişlerdir. Sıcak ve yağışlı aylarda daha yüksek populasyon yoğunluğunu gözlemlemişlerdir. Bu patojen dolu, don, budama ve hasattan kaynaklanan yaralardan uygun koşulları yakaladığında saprofitikten parazite geçtiğini saptamışlardır.

2. 4. Mücadele

Türkmenoğlu (1965), zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* üzerinde antibiyotikli preparatlarla çalışmalarda bulunmuştur. Streptomisin nitrate, streptomisin ve terramisin bulunduran antibiyotiklerle yapılan denemelerde urların rengi ilaçlama sonrası koyu kahveye döndüğünü belirtmiştir.

Shoda (2000) ve Whipps (2001), yaptıkları *in vitro* koşullardaki denemelerde *Bacillus subtilis* izolatları F1 ve F-4 ün *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı etkileri oluşturdukları inhibisyon bölgeleri ile belirlemişlerdir. Önceki çalışmalarda *Bacillus subtilis* antimikrobiyal aktivite ile metabolit üretimi sistemik direnç olmak üzere etki mekanizmaları gözlemlemişlerdir.

Lavermicocca ve ark. (2002), zeytin dal kanseri hastalığı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin kontrolünün patojenin konukçu aralığının geniş olmasından dolayı zor olduğu bildirmişlerdir. Mevcut kontrol stratejileri arasında sürekli bakırlı kimyasal pestisitler kullanılmasının toksisite, dayanıklılık, çevre kirliliği, insan ve hayvan sağlığında tehlikeler gibi istenmeyen etkilere neden olduğu belirtmişlerdir. Alternatif olarak antagonist mantar ve bakteri kullanarak bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü bitki hastalıklarının yönetimi için önem kazandığını belirtmişlerdir.

Liu ve ark. (2007), tarafından *Bacillus subtilis*' in doğada yaygın bulunması insan ve hayvan sağlığına toksik olmaması, bitkilerde patojen olmaması gibi özelliklerinden dolayı biyolojik mücadelede olanaklarını araştırmışlardır. Bu bakterinin *in vitro* koşullarda yapılan denemelerde zwittermicin-A, kanosamin, lipopeptidler ve antifungal antimikrobiyal bileşikler ürettiği gözlenmiştir. Birkaç *Bacillus subtilis* izolatının bazı bitki patojenlerini kontrol etmede başarılı bulmuşlardır.

Rokni Zadeh ve ark. (2008), *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda birkaç floresan *Pseudomonas*' ın *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda çeşitli *Rhizobium* türlerinin bakteriyosinler üreterek *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye antibakteriyel aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Kacem ve ark. (2009), yılında yaptıkları çalışmalar sonucunda *Bacillus* ve *Pseudomonas* biyolojik mücadelede çeşitli hastalıklara karşı kullanılan önemli bakteri cinsleri olarak belirtmişlerdir.

Krid ve ark. (2010), simptomsuz zeytin yapraklarından izole edilen *Bacillus subtilis* izolatlarının zeytin dal kanseri hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 'ye karşı biyokontrol özelliğini değerlendirmişlerdir. *Bacillus subtilis* F1 ve F-4 izolatlarının patojene karşı antibakteriyel etki gösterdiğini saptamışlardır. *Bacillus subtilis* F1 izolatu tarafından üretilen aktif bileşiğin protein kökenli olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar *Bacillus subtilis* F1 izolatının zeytin dal kanseri hastalığının biyolojik kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Üstün ve ark. (2010, 2011), yıllarında bazı zeytin çeşitlerinin zeytin dal kanseri hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ye karşı duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi için çalışmalar yürütmüşlerdir. Hastalığın mücadelesi güç olduğundan dayanıklı çeşit en önemli mücadele alternatiflerinden biri olduğunu düşünmüşlerdir. Çalışma kapsamında 2010-2011 yıllarında Ege, Akdeniz, Marmara bölgelerinden örnekler alınıp izolasyon çalışmaları sonucu elde edilen izolatlar biyokimyasal ve moleküler testler ile tanılamışlardır. Yaygın yetiştirilen zeytin çeşitlerinin hastalığa duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Denemeler sonunda hiçbir dayanıklı çeşit bulunmamış, Memecik, Ayvalık, Uslu çeşitleri test edilen çeşitler arasında hastalığa en az duyarlı çeşitler olduğunu bildirmişlerdir.

Maldonado-González ve ark. (2013), zeytin dal kanseri hastalığına neden olan *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 ve *Verticillium solgunluğuna* karşı bir kök endofitiği olan *Pseudomonas fluorescens* PICF7 izolatu ile yapılan çalışmanın etkili olduğunu saptamışlardır. *In vivo* koşullarda zeytin bitkilerinin kullanılarak yapılan çalışmalarda, biyolojik mücadele etmeni izolat kökte patojen ile birlikte ya da ayrı ayrı inokule edildiği zamanlarda, zeytin dal kanseri etmeninin gelişimini ne kadar etkin bir şekilde kontrol ettiğini değerlendirmişlerdir. *Pseudomonas fluorescens* PICF7'in yapay inokülasyonlarla kök üzerinde kolonize olabildiğini ve bunu devam ettirebildiğini göstermiştir. Her iki uygulamada da *Pseudomonas fluorescens* PICF7 hastalık gelişimini baskılayamadığı halde, bu etmenin varlığının patojen popülasyonunu, nekrotik tümör oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir.

Ghanney ve ark. (2016), yaptıkları çalışma ile *Bacillus mojavensis* ABC-7' nin zeytin dal kanseri etmeni üzerindeki potansiyel etkisini incelemişlerdir. *Bacillus mojavensis* A-BC-7'in, riphampicine (100 ppm)'e dayanıklı mutant *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ITM317- *Rif* izolatu için potansiyel bir biyolojik mücadele ajanı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bir yıllık zeytin bitkilerinde yapılan çalışmalarda, farklı oranlardaki patojen ve biyolojik mücadele etmenini aynı anda bitkilere inokule etmişlerdir. Çalışma sonucunda, *Bacillus mojavensis* A-BC-7 izolatının patojenin popülasyonunu azalttığını ve daha az nekrotik tümör oluşumu meydana geldiğini ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL-METOD

3.1. Materyal

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* izolatları, besi yerleri, farklı kimyasal maddeler, laboratuvar malzemeleri, inkübatör, etüv, otoklav, pH metre, zeytin çiçekleri ve zeytin sürgün ucu yapraklarının izolasyonlarından elde edilen süspansiyonlar bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Kullanılan bitki materyalleri 2016 yılı ve 2017 yılı Tekirdağ ili Şarköy ilçesi ve mahalleleri zeytin üretim alanlarından toplanmıştır. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları 2016 yılında Tekirdağ ili zeytin üretim alanlarından izole edilmiş olup, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarında stok kültür olarak -20 °C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Gram reaksiyon testinde kontrol olarak Prof. Dr. Yeşim AYSAN' dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kullanılmıştır. Levan oluşumu ; Pozitif kontrol olarak Ziraat Yüksek Mühendisi Nesrin TUNALI' dan temin edilen *Erwinia amylovora* 57 izolatu kullanılmıştır. Pektolitik aktivite; Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Arazi çalışmasında surveylenen ağaçlar Lazarow (1961) metoduna göre incelenmiştir. Bu metoda göre 20 meyve ağacı olan bahçenin %100'ü, 21-70 meyve ağacı olan bahçede 21-30 ağaç, 151-500 meyve ağacı olan bahçede 41-80 ağaç, 501-1000 meyve ağacı olan bahçede ağaçların %15'i, 1000'den fazla meyve ağacı olan bahçede ağaçların %5' i (en az 150 ağaç) kontrol edilmiştir.

Arazi çalışmaları, 2016 ve 2017 yıllarında Şarköy ilçesi ve Mürefte, Güzelköy, Hoşköy mahallelerinde zeytin bahçelerine survey yapılmıştır. Her incelemede, bahçede bulunan ağaçlar zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* belirtileri açısından görsel olarak incelenmiş ve hastalık belirtisi gösteren bitki materyalleri örnek olarak alınarak laboratuvara getirilmiştir. Ayrıca aday antagonist bakterilerin izolasyonu için zeytin çiçeği ve sürgün uç yaprakları toplanmıştır.

Çalışma kapsamında, 2016 üretim yılında 11 ve 2017 üretim yılında 4 zeytin bahçesi olmak üzere toplam 15 zeytin bahçesi incelenmiştir.

Ağaçlarda tipik zeytin dal kanseri belirtisi olan, ur oluşumu gösteren dallardan örnekler kesilerek gazetelere sarılmış ve polietilen torbalara konularak, etiket bilgileri yazıldıktan sonra buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerden 24-48 saat içerisinde izolasyon yapılmaya başlanmıştır.

3.2.2. İzolasyon Çalışmaları

3.2.2.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ile enfekteli olduğu düşünülen örneklerin urlu kısımlarından küçük parçalar alınmış, bu parçalar %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 2 dakika ve daha sonra 3 kez steril saf su içerisinde 2 şer dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra steril kurutma kağıtları ile kurulanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan bu parçalar saline buffer ile steril havanlarda ezilerek bakterinin salinebuffer ortamına geçişi sağlanmıştır. Havanlarda ezilen örnekler 20-30 dk steril kabinde bekletilmiştir. Bekleme süresi dolduğunda steril kabinde King B (EK 1) besi ortamı içeren petrilere süspansiyondan bir öze dolusu alınarak üç çizgi yöntemiyle ekim yapılmıştır (Janse 2006). Petriler 48 saat 25 °C' de inkübe edildikten sonra +4 °C' de 24 saat süresince buzdolabında bekletilmiştir. Bunun nedeni Mirik ve ark. (2008) belirttiği gibi petri yüzeyinde sarı renkli saprofit bir bakteri gelişerek petriyi kaplamakta ve patojeni izole etmeyi engellemektedir. Bu aşamadan sonra King B besi yerinde zayıf floresan tipte, küçük yuvarlak ve kabarık olmayan tipte gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Saflaştırılan koloniler, 24 °C'de 24- 48 saat süre ile inkübatörde gelişim gösterdikten sonra, içerisinde YDCA (EK 2) besi ortamı bulunan tüplere aktarılmıştır. Krem renkli floresan koloni gelişimleri gösteren izolatlar seçilerek alınmış ve LOPAT testleri için kullanılmıştır (Lelliot ve Stead 1987). Tütün bitkisinde (*Nicotiana tabacum*) hipersensitif reaksiyon (HR) pozitif sonucunu veren izolatlar cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış besi ortamına ekim yapılarak etmen daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C' deki buzdolabına kaldırılmıştır.



Şekil 3. 1. Zeytin *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ur belirtisi ve urlardan izolasyon

3.2.2.2. Zeytin Çiçek ve Yapraklarından Aday Antagonist İzolasyonu

Zeytin çiçek ve sürgün ucu yapraklarından izolasyon yapmak için toplanan örneklerden 10'ar g tartılarak, 90 ml nutrient broth (EK 3) içerisine konulmuş ve orbital çalkalayıcı 60 dk karıştırılmıştır. Daha sonra süspansiyondan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml salin buffer bulunan tüplere aktararak sulandırma serileri hazırlanmıştır. Bu işlem -6' ya kadar tekrarlanmıştır. Seyreltme serilerinde -4, -5 ve -6'dan 100 ml alınarak içerisinde NA (EK 4) besi ortamı bulunan petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır (Şekil 3.2.). Ekimi yapılan petrilere 25 °C' de inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda morfolojik olarak farklı kolonilerden rastgele seçilmiş ve ekim yapılmıştır. Petri yüzeyinde farklı kolonilerden saflaştırılmalar yapılmıştır. İzolatlara tütün HR testi yapılarak negatif sonuç veren izolatlar aday antagonist olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 2. Zeytin çiçek ve yapraklarından aday antagonist izolasyonu

3.2.2.3. Topraktan Aday Antagonist İzolasyonu

Topraktan alınan örneklerden 10'ar g tartılarak, üzerlerine 90 ml nutrient broth eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlar orbital çalkalayıcı da 60 dk karıştırılmıştır. Daha sonra 6 kat seyreltme serisi yapılmıştır. NA besi ortamına 100 µl süspansiyon alınarak ekimleri yapılmış ve 25 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Petri yüzeyinde farklı kolonilerden saflaştırılmalar yapılmış bütün HR testi yapılarak negatif sonuç veren izolatlar aday antagonist olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.4. Fosfat Çözme Özelliklerinin Belirlenmesi

Zeytin çiçek, yaprakları ve topraktan elde edilen aday antagonist izolatların NBRIP (EK 6) besi ortamı kullanılarak fosfat çözme yetenekleri gözlenmiştir.

3.2.3. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi

Patojenite testi etmenin tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. İzolasyonu yapılan nutrient agar besi ortamında geliştirilen 24 saatlik *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları zeytin fidanlarında yaralar oluşturularak inokule edilmiştir. İnokule edilen bölgeler nemlendirilmiştir. Yaklaşık 60 gün sonra fidanlar değerlendirmeye alınmıştır. Yara dokusu etrafına açık yeşil renkte ur belirtisi oluşturduğu gözlenmiştir. Ur belirtisi gösteren bitkilerden izole edilen 52 izolat patojenite testinde pozitif sonuç vermiştir. Negatif kontrolde steril saf su kullanılmıştır (Janse 1981).

3.2.4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Tanılama Çalışmaları

3.2.4.1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testleri

Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının 24 saatlik kültürlerinden steril kürdanla alınarak solüsyona karıştırılmıştır. Bunu takip eden 20-30 saniye içerisinde kürdan yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Gram reaksiyon testinde kontrol olarak Prof. Dr. Yeşim AYSAN' dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kullanılmıştır.

3.2.4.2. Levan Oluşumu

Levan oluşumunu gözlemek için besi ortamı olarak %5 oranında sakkoroz içeren NA kullanılmıştır. NA besi ortamına üç çizgi yöntemi ile ekim yapılmıştır. 3-5 günlük inkubasyondan sonra pozitif reaksiyon verenler beyaz mukoid, tümsek şeklinde koloni oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Levan oluşumunda pozitif kontrol olarak Ziraat Yüksek Mühendisi Nesrin TUNALI' dan temin edilen *Erwinia amylovora* 57 izolatı kullanılmıştır.

3.2.4.3. Oksidaz Testi

Oksidaz testi için, %1'lik taze olarak N;N;N;N; Tetramethyl-p-phenylendiamine dhydrochloride solüsyonu hazırlanmış ve steril filtre kağıdına damlatılmıştır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları ve referans izolatın 24 saatlik kültüründen steril kürdanla alınarak ıslak kurutma kağıdına yayılmıştır. Yayılmadan 10 saniye sonra maviye dönerse pozitif, 15- 60 saniye sonra maviye dönüşürse geç pozitif, 60 saniye sonrası mavi renk oluşumu gözlenmez ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs 1956).

3.2.4.4. Pektolitik Aktivite Testi

Patates yumrularının yüzeysel dezenfeksiyonunu sağlamak için önce yıkanmış ve daha sonra %1 NaOCl' da 3 dakika bekletilmiştir. Yumruların NaOCl' den arındırılması için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Her bir petriye petri çapına göre steril kurutma kağıtları kesilerek yerleştirilmiş ve steril damıtık su ile nemlendirilmiştir. Patates yumruları soyulduktan sonra 7-8 mm kalınlığında dilimlenip petrolere yerleştirilmiştir. Her bir patates dilimi üzerinde bakteri kültürleri öze ile sürülmüştür. 24 saatlik inkübasyondan sonra inokulasyon noktasında yumuşama varsa pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (De Boer ve ark. 2001).

3.2.4.5. Arginin Dihydrolase Testi

Arginin dihydrolase testi için 1.0 g Peptone, 5.0 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 0.01 g Phenolred, 10 g L (+) Arginin HCL, 3 g Agar 1000 ml saf su içerisinde ısıtılarak hazırlanan besi ortamı 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra Ph:7.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. 3 ml lik tüplere konulduktan sonra 121 °C 15 dakika otoklavda sterilizasyon sağlanmıştır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları ve referans izolatın 24 saatlik kültüründen yarım aşılama yapılmıştır. Üzeri 2 ml steril vaspar (EK 5) ile örtülmüştür. Kontrol olarak 3 tüp aşılammamıştır 10-12 günlük bir inkübasyondan sonra kırmızı renkteki besi ortamı vişne rengini veren kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead 1987).

3.2.4.6. Tütün' de Aşırı Duyarlılık Testi (Hipersensitif Reaksiyon: HR)

Tütün 3-4 yapraklı duruma geldiğinde 10^8 hücre/ml' lik bakteri süspansiyonunun ince uçlu enjektör kullanılarak yaprağın alt yüzeyinden iki damar arasına hücreler arasındaki alana enjekte edilmiştir. İnokule edilen kısımların 24-48 saat sonra nekroz şeklinde belirti vermesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve Goodman 1967).

3.2.5. Zeytin Çiçek ve Yapraklarının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin Gelişimine Antagonistik Etkisi

Patojenin ml' deki Hücre Sayısının Belirlenmesi: King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm 0.2 ölçüm değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlardan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml nutrient broth bulunan tüplerde -6' ye kadar seyreltme serileri yapılmıştır. Seyreltme serilerinden -4, -5 ve -6 ' dan 100 ml alınarak içerisinde King B besi ortamı bulunan konulmuş ve bir baget yardımı ile ortam üzerine yayılmıştır. Her bir seyreltme için 3 adet petri kullanılmıştır. 25°C' de 48 saat inkübasyondan sonra petrilere gelişen koloniler sayılarak ml' deki hücre yoğunluğu hesaplanmıştır (Klement ve ark. 1990).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Şekil 4.1.' de görüldüğü gibi Tekirdağ ilinde önemli zeytin üretimi yapılan ilçe ve mahallelerden zeytinden 78 adet toplanan hastalıklı bitki örneklerinden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda toplam 52 adet patojen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatu elde edilmiştir.



Şekil 4. 1. Tekirdağ İli Şarköy ilçesi survey yapılan mahalleler

Çizelge 4. 1. Tekirdağ’ da bulunan zeytin bahçelerindeki toplanan örnek sayıları

BAHÇE SAYISI	İLÇE VE MAHALLE	MEVKİ	GEZİLEN BAHÇE SAYISI	TOPLAM ÜRETİM ALANI (DEKAR)	AĞAÇ SAYILARI	TOPLANAN ÖRNEK SAYILARI
1	ŞARKÖY	MÜREFTE YOLU	1	3.5	130	6
2	ŞARKÖY	KOKARSU	1	28.5	750	4
3	ŞARKÖY	MERKEZ	1	4	150	10
4	MÜREFTE	MÜREFTE	1	7.5	200	8
5	MÜREFTE	MÜREFTE	1	3	100	6
6	MÜREFTE	MÜREFTE YOLU	1	4.5	140	5
7	MÜREFTE	MESELYE	1	1.5	50	4
8	MÜREFTE	MESELYE	1	2	70	5
9	MÜREFTE	KALAMIŞ	1	3	110	7
10	MÜREFTE	KALAMIŞ	1	2	60	5
11	GÜZELKÖY	GÜZELKÖY	1	1	35	-
12	GÜZELKÖY	GÜZELKÖY	1	1	30	-
13	HOŞKÖY	AYAZMA	1	1.5	50	5
14	HOŞKÖY	DERE	1	2	70	7
15	HOŞKÖY	SU SEDDİ	1	1.5	50	6



Şekil 4. 2. Hoşkøy’de zeytin bahçesi hastalıklı bitki örneklerinin incelenmesi



Şekil 4. 3. Mürefte’ de hastalıklı bitki örneklerinin incelenmesi

Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.’te de görüldüğü üzere 2016-2017 yılında yapılan arazi çalışmaları sonucu 15 zeytin bahçesi gezilmiş ve bu bahçelerden 13 tanesinde hastalık tespit edilerek hastalığın yaygınlığı % 33 olarak belirlenmiştir.

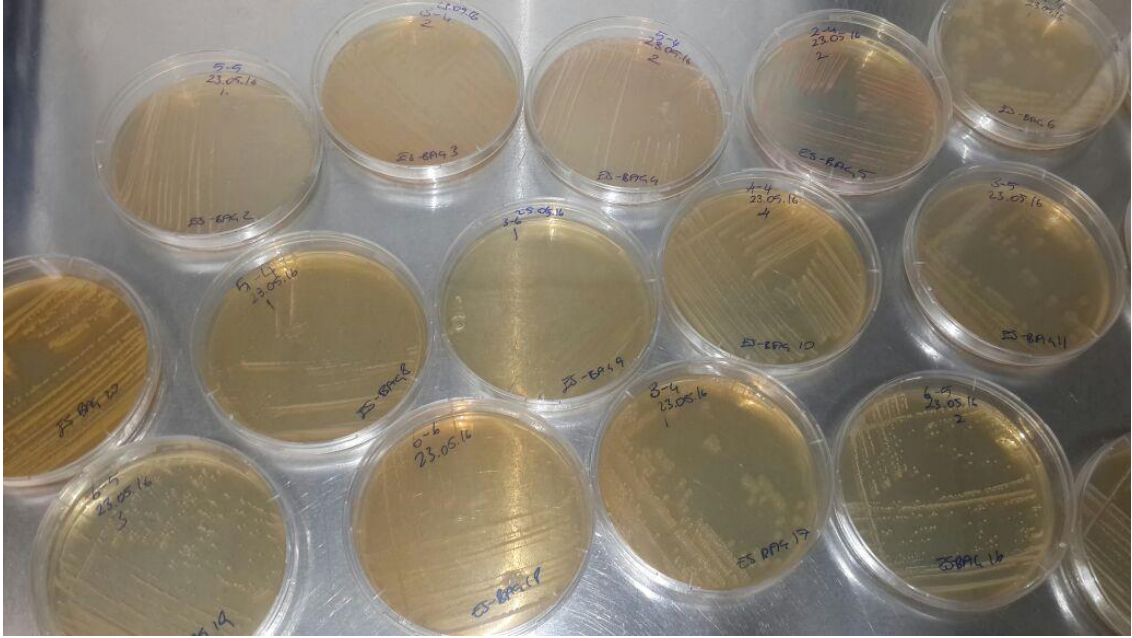
4.2. İzolasyon Çalışmaları

4.2.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolasyonu

İzolasyonda King B besi ortamında zayıf floresan tipte, küçük yuvarlak ve kabarık olmayan tipte gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Krem renkli floresan koloni gelişimleri gösteren izolatlar seçilerek alınmış ve LOPAT testleri için kullanılmıştır (Lelliot ve Stead 1987). Tütün bitkisinde (*Nicotiana tabacum*) hipersensitif reaksiyon (HR) pozitif sonucunu veren 52 adet patojen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış (YDCA) besi ortamına ekim yapılmıştır ve +4 °C’ deki buzdolabına kaldırılmıştır.

4.2.2. Zeytin Çiçek ve Yapraklarından Aday Antagonist İzolasyonu

Zeytin çiçek ve sürgün ucu yapraklarından izolasyon nutrient agar besi ortamı bulunan petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri yüzeyinde farklı kolonilerden saflaştırılmalar yapılmış ve elde edilen bakteri izolatları tütünde HR testi yapılarak negatif sonuç veren izolatlar aday antagonist olarak değerlendirilip ikili kültür denemelerinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı 50 adet izolat kullanılarak denemelerde kullanılmak için seçilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4. 4. Zeytin yaprak ve çiçeğinden elde edilen aday antagonist bakteri izolatları

4.2.3. Toprakdan Aday Antagonist İzolasyonu

Toprakta alınan örneklerden yapılan izolasyonda NA besi ortamına seyreltmelerden 100 µl alınarak ekimleri yapılmış ve 25 °C' de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Petrideki gelişmiş farklı kolonilerden saflaştırılmalar yapılmıştır. Aday antagonist bakteriler tütün HR testi yapılarak negatif sonuç veren 60 adet izolat ayrılmıştır. Bu izolatların ikili kültür denemelerinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı etkinlikleri testlenmiştir.

4.2.4. Fosfat Çözme Özelliklerinin Belirlenmesi

Zeytin çiçek, yaprakları ve topraktan elde edilen aday antagonist izolatların NBRIP (EK 6) besi ortamı kullanılarak fosfat çözme yetenekleri test edilmiştir. Yapılan petri çalışmalarında bu tez kapsamında kullanılan çiçekten 30, yapraktan 20 ve topraktan 60 adet olmak üzere aday antagonist izolatların fosfat çözme yeteneği gözlenmemiştir.

4.3. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi

King B besi ortamında geliştirilmiş olan 24 saatlik bakteri izolatların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatı zeytin fidanlarına yara açılarak inokule edilmiştir (Şekil 4. 5.). İnokulasyondan yaklaşık 660 gün sonra değerlendirme yapılmıştır. Yara dokusunun etrafında açık yeşil veya açık kahverengi, yumuşak ur belirtileri oluşturduğu görülmüştür. Ur belirtileri gösteren 52 izolatın patojenitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.



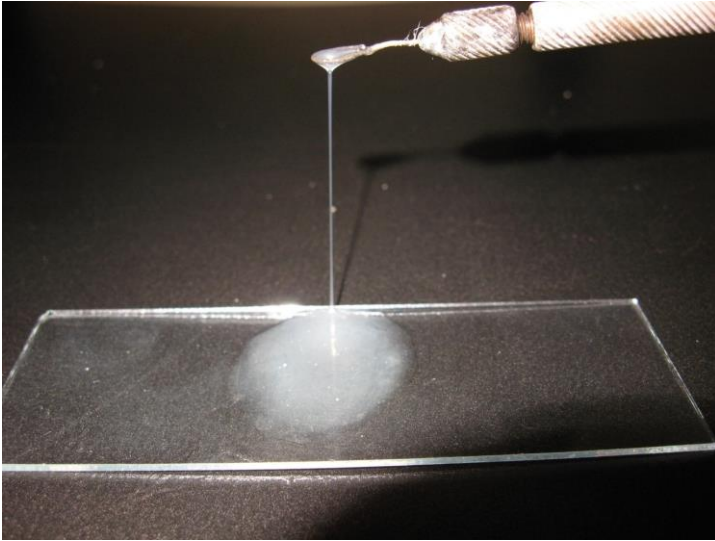
Şekil 4. 5. Zeytin fidanlarında patojenite testi

Negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkilerde herhangi bir ur belirtisine rastlanmamıştır. Uru dokulardan yapılan re-izolasyonlarda 52 adet re-izolat elde edilmiştir. İzolasyonlarda, petrilerinin 25 °C’ de 2 gün inkübasyonu takiben +4 °C’deki buzdolabında 24 saat bekletilmesi Mirik ve ark. (2008)’nın da belirttiği gibi izolasyon petrisindeki sarı renkli saprofit bakteri gelişimini baskılayarak yavaş gelişen patojenin gelişimine müsaade etmiştir. Böylelikle patojen bakteri kolaylıkla izole edilmiştir. Elde edilen re-izolatlarla tanı çalışmaları yapılmak için eğik besi yerinde +4 °C’ de buzdolabında saklanmıştır.

4.4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Tanı Testleri

4.4.1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi

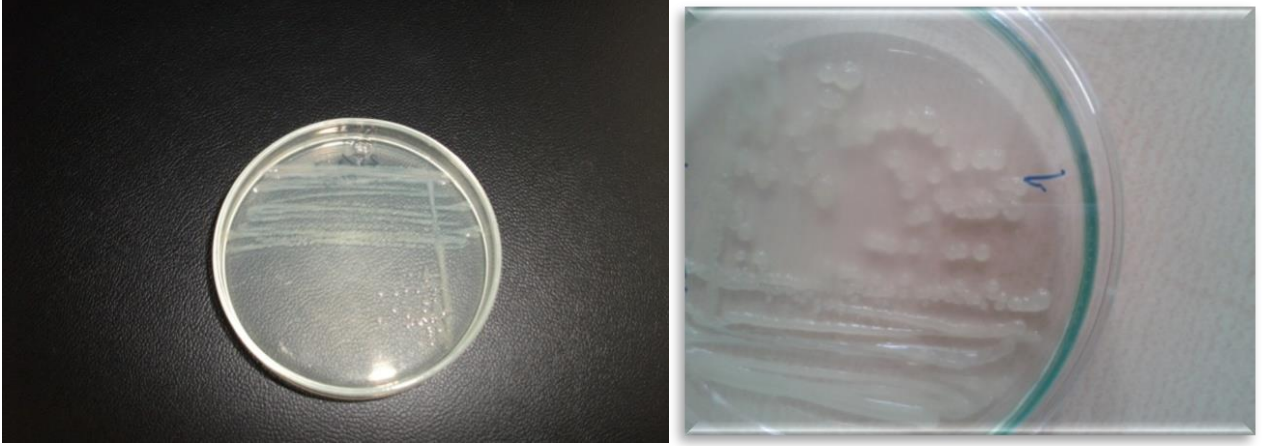
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* izolatları yapılan KOH testi sonucunda özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturmasından dolayı gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.). Testlenen 52 izolatın tamamı benzer sonuç vermiştir. Gram reaksiyon testinde karşılaştırma kültürü olarak kullanılan Prof. Dr. Yeşim AYSAN’ dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kullanılmıştır.



Şekil 4. 6. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları yapılan KOH testi sonucunda özeye yapışarak oluşturduğu sümüksü yapı

4.4.2. Levan Oluşumu

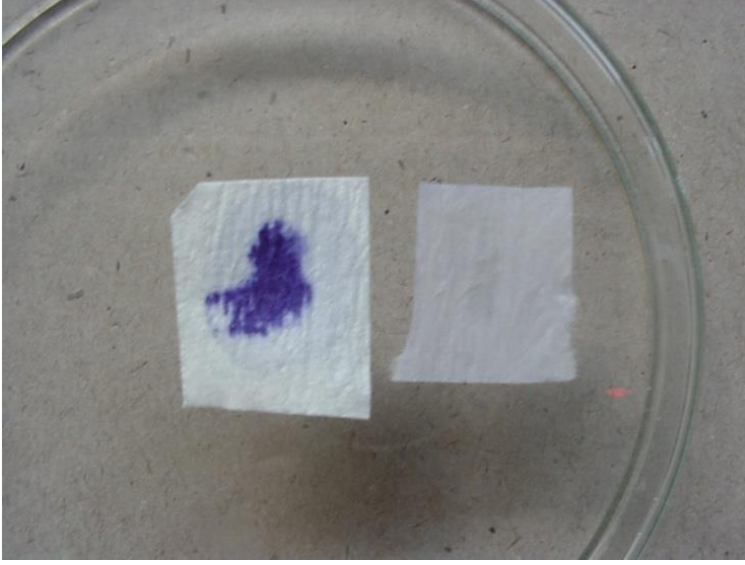
Sukroz nutrient agar ortamına ekimi yapılan izolatların tamamı inkübasyon süresinin sonucunda petride beyaz mukoid, tümsek şeklinde koloni oluşturmazken pozitif kontrol olarak Ziraat Yüksek Mühendisi Nesrin TUNALI' dan temin edilen *Erwinia amylovora* 57 izolatının kolonileri bu besi yerinde inci gibi beyaz ve tümsek şeklinde gelişmiştir (Şekil 4.7. ve Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.).



Şekil 4. 7. Levan Oluşumu

4.4.3. Oksidaz Testi

Taze olarak hazırlanan N;N;N;N;Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochlorideden % 1' lik solüsyon kurutma kağıdı üzerine bir damla damlatılıp bakteri kültüründen kürdan yardımı ile filtre kağıdına sürüldüğünde 60 sn içinde izolatların tümünde bir renk değişimi olmadığından dolayı oksidaz negatif olarak değerlendirilirken, pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas cichori* kültürü bu süre içinde mor renkte bir değişime neden olmuştur (Şekil 4. 8 ve Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.).



Şekil 4. 8. Oksidaz testi sonucu oluşan renk değişimi

4.4.4. Pektolitik Aktivite Testi

İzolatların hiçbiri pektolitik enzim üretmediğinden patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmazken pozitif kontrol olarak *Pectobacterium caratovorum* kullanılmış ve patates dilimlerinde çürümelere neden olmuştur (Şekil 4. 9. ve Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.).



Şekil 4. 9. Pektolitik aktivite testi negatif ve pozitif sonucu

4.4.5. Arginin Dihydrolase Testi

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* izolatları ekim yapılan tüplerin üzeri 1 ml vaspar ile kapatılmış ve 7-15 gün 25°C'de bekletildikten sonra tüplerde herhangi bir renk değişimi gözlenmemesinden dolayı negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.10. ve Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.).



Şekil 4. 10. Arginin dihydrolase testi

4.4.6. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

Re izolasyon sonucu toplam 52 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların tamamı tütün yapraklarında 24 saat sonra su emmiş alanlar ve 48 saat sonra nekroz oluşturmuş alanlar gözlenmiştir (Şekil 4.11. ve Çizelge 4.2, Çizelge 4.3.). Tütün aşırı duyarlılık HR reaksiyonları pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 11. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının tütün yaprak damar aralarında oluşturduğu tipik aşırı duyarlılık reaksiyonu (Hipersensitive Reaksiyon HR)

Çizelge 4. 2. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının klasik test sonuçları

İZOLAT SAYISI	İZOLAT ADI	ALINDIĞI YER	Gram Reak.	L	O	P	A	T
1	Ş1	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
2	Ş2	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
3	Ş3	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
4	Ş4	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
5	Ş5	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
6	Ş6	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
7	Ş7	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
8	Ş8	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
9	Ş9	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
10	Ş10	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
11	Ş11	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
12	Ş12	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
13	Ş13	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
14	Ş14	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
15	M15	MÜREFTE	-	-	-	-	-	+
16	M16	MÜREFTE	-	-	-	-	-	+
17	M17	MÜREFTE	-	-	-	-	-	+
18	M18	MÜREFTE	-	-	-	-	-	+
19	M19	MÜREFTE	-	-	-	-	-	+
20	Ş20	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
21	Ş21	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
22	Ş22	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
23	Ş23	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
24	Ş24	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
25	Ş25	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
26	Ş26	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
27	Ş27	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
28	Ş28	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+

29	Ş29	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
30	Ş30	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
31	Ş31	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
32	Ş32	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
33	Ş33	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
34	H34	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
35	H35	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
36	H36	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
37	H37	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
38	H38	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
39	H39	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
40	H40	HOŞKÖY	-	-	-	-	-	+
41	Ş41	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
42	Ş42	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
43	Ş43	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
44	Ş44	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
45	Ş45	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
46	Ş46	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
47	Ş47	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
48	Ş48	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
49	Ş49	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
50	Ş50	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
51	Ş51	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+
52	Ş52	ŞARKÖY	-	-	-	-	-	+

L: Levan Tipte Koloni Gelişimi; **O:** Oksidaz Testi; **P:** Patateste Pektolitik Aktivite; **A:** Arginin Dehidrolaz Aktivitesi; **T:** Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu

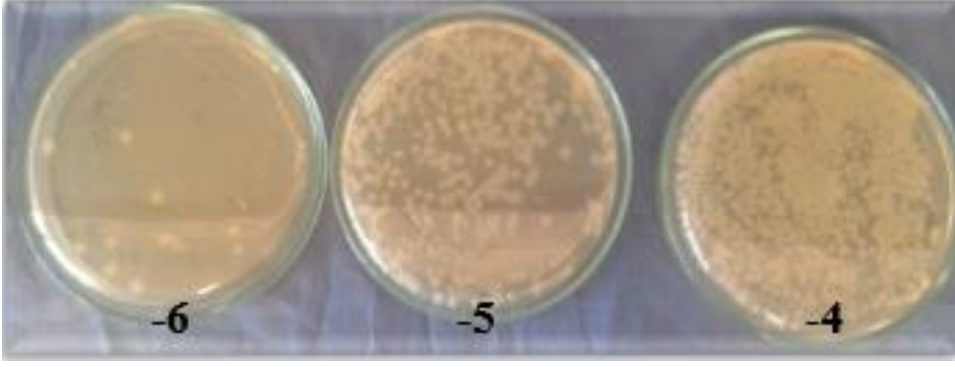
Çizelge 4. 3. Lopat Test Sonuçları

TESTLER		Gram Reaksiyon	LOPAT				
			Levan oluşumu	Oksidaz testi	Pektolitik aktivite testi	Arginin dihidrolase testi	Tütünde aşırı duyarlılık testi (HR)
Test Sonuçları	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (52 izolat)	-	-	-	-	-	+
	Referans İzolat (CFPB 1672)	-	-	-	-	-	+

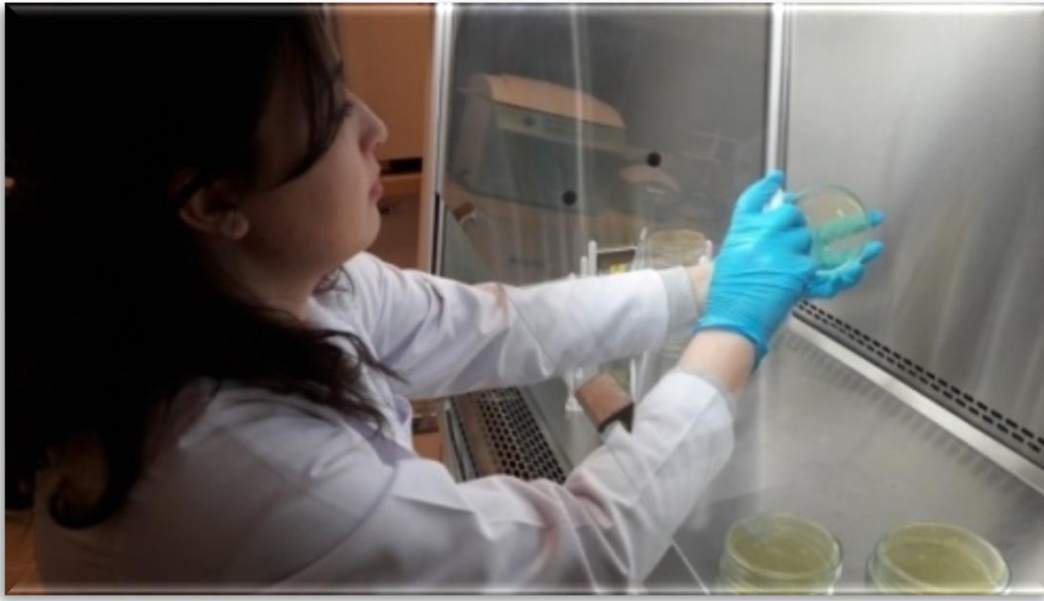
Yapılan tanı çalışmaları sonucunda elde edilen 52 izolat LOPAT karakteri olarak ----+ özellik göstererek *Pseudomonas* LOPAT 1b grubu içerisinde olduğu belirlenmiştir.

4.5. Zeytin Çiçek ve Yaprakların *In vitro* Koşullarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin Gelişimine Antimikrobiyal Etkisi

Patojenin ml' deki Hücre Sayısının Belirlenmesi: King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm absorbans değeri 0.2 ölçüm değerine ayarlanarak süspansiyonun hücre/ml yoğunluğu hesaplanmıştır. (Klement ve ark. 1990). Hesaplamalar -6 seyreltmesine göre yapıldığında Şarköy 80×10^6 , Çanakkale 66×10^6 , Akçay 993×10^5 hücre/ml hücre yoğunluğu hesaplanmıştır. Bakteri süspansiyonu Çanakkale, Akçay, Şarköy izolatlarından aynı hacimlerde alınarak karıştırılmıştır ve ikili denemelerde kullanılmıştır (Şekil 4.12., Şekil 4.13.).



Şekil 4. 12. Patojenin ml' deki hücre sayısının belirlenmesi



Şekil 4. 13. Aday antagonistlere karşı *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* patojeninin yüzeye püskürtülmesi

4.6. Aday Antagonistlerin Besi Ortamında Etkinlikleri

Antagonistik etkiyi anlamak için *in vitro* koşullarda 3 nokta ekim deseni kullanılarak testlenmiştir. İkili kültür karşılaştırma sonucunda Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi aday antagonist izolatları ile patojen arasında engelleme zonu oluşmuştur. Testleme 110 adet aday izolat kullanılmıştır. Şekil 4.14'de ve Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi etkili antagonistler farklı oranlarda inhibisyon zonu oluşturmuştur. Etkili olan 23 adet izolataın 9 tanesi çiçeklerden, 3 tanesi yapraktan ve 11 tanesi topraktan elde edilen antagonist bakteriler inhibisyon zonları oluşturmuştur.

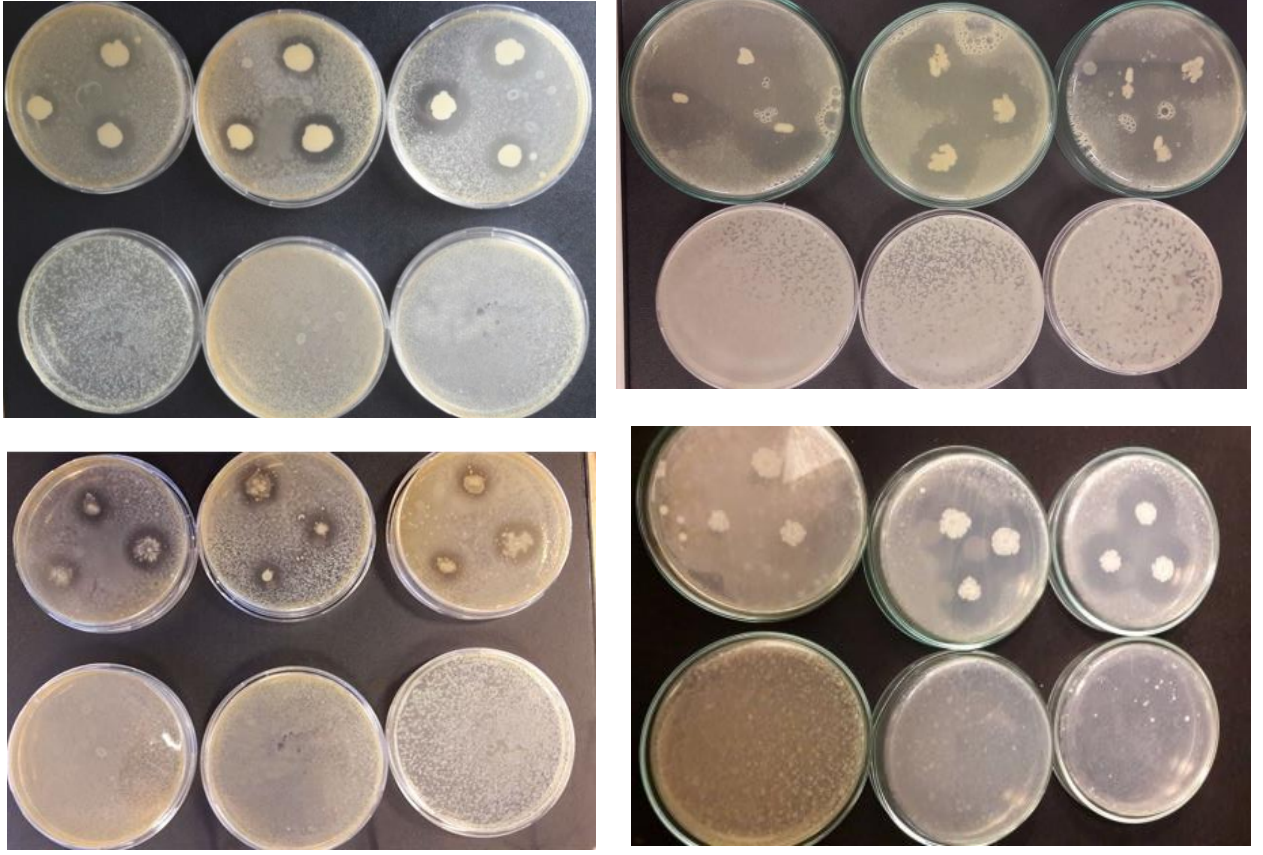
Çizelge 4. 4. Aday bakteriyel antagonistlerin oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)

SIRA NO	İZOLAT ADI	İNHİBİSYON ZONU (mm)			İNHİBİSYON ZONU ORTALAMASI
		TEKERRÜRLER			
		1	2	3	
1	ES BAÇ 1	3	3	2	2.6
2	ES BAÇ 2	2	1	2	1.6
3	ES BAÇ 3	-	-	-	-
4	ES BAÇ 4	-	-	-	-
5	ES BAÇ 5	-	-	-	-
6	ES BAÇ 6	-	-	-	-
7	ES BAÇ 7	4	5	6	5
8	ES BAÇ 8	3.8	3.6	3.1	3.5
9	ES BAÇ 9	-	-	-	-
10	ES BAÇ 10	5	4	5	4.6
11	ES BAÇ 11	-	-	-	-
12	ES BAÇ 12	4	3.6	4	3.8
13	ES BAÇ 13	-	-	-	-
14	ES BAÇ 14	-	-	-	-
15	ES BAÇ 15	-	-	-	-
16	ES BAÇ 16	-	-	-	-
17	ES BAÇ 17	-	-	-	-
18	ES BAÇ 18	-	-	-	-
19	ES BAÇ 19	-	-	-	-
20	ES BAÇ 20	6	5	4	5
21	ES BAÇ 21	-	-	-	-
22	ES BAÇ 22	3.8	3.5	6	4.4
23	ES BAÇ 23	-	-	-	-
24	ES BAÇ 24	-	-	-	-
25	ES BAÇ 25	2.8	3.8	4.1	3.5

26	ES BAÇ 26	-	-	-	-
27	ES BAÇ 27	-	-	-	-
28	ES BAÇ 28	-	-	-	-
29	ES BAÇ 29	-	-	-	-
30	ES BAÇ 30	-	-	-	-
31	ES BAY 1	-	-	-	-
32	ES BAY 2	4	4	7	5
33	ES BAY 3	10	11.5	9	10.1
34	ES BAY 4	-	-	-	-
35	ES BAY 5	-	-	-	-
36	ES BAY 6	-	-	-	-
37	ES BAY 7	-	-	-	-
38	ES BAY 8	15	4	5	8
39	ES BAY 9	-	-	-	-
40	ES BAY 10	-	-	-	-
41	ES BAY 11	-	-	-	-
42	ES BAY 12	-	-	-	-
43	ES BAY 13	-	-	-	-
44	ES BAY 14	-	-	-	-
45	ES BAY 15	-	-	-	-
46	ES BAY 16	-	-	-	-
47	ES BAY 17	-	-	-	-
48	ES BAY 18	-	-	-	-
49	ES BAY 19	-	-	-	-
50	ES BAY 20	-	-	-	-
51	T45	-	-	-	-
52	T46	-	-	-	-
53	T47	-	-	-	-
54	T48	-	-	-	-
55	T49	-	-	-	-
56	T50	-	-	-	-
57	T51	3	4	3	3.3
58	T52	-	-	-	-

59	T53	-	-	-	-
60	T54	-	-	-	-
61	T55	-	-	-	-
62	T56	-	-	-	-
63	T57	-	-	-	-
64	T58	-	-	-	-
65	T59	11.6	11	10	10.8
66	T60	4	3	3	3.3
67	T61	-	-	-	-
68	T62	3	4	3	3.3
69	T63	-	-	-	-
70	T64	-	-	-	-
71	T65	-	-	-	-
72	T66	-	-	-	-
73	T67	-	-	-	-
74	T68	7	8	9	8
75	T69	-	-	-	-
76	T70	1	1	1	1
77	T71	-	-	-	-
78	T72	-	-	-	-
79	T73	9	1	1	3.6
80	T74	-	-	-	-
81	T75	-	-	-	-
82	T76	-	-	-	-
83	T77	-	-	-	-
84	T78	-	-	-	-
85	T79	-	-	-	-
86	T80	-	-	-	-
87	T81	-	-	-	-
88	T82	8	7	7	7.3
89	T83	-	-	-	-
90	T84	-	-	-	-
91	T85	-	-	-	-

92	T86	-	-	-	-
93	T87	-	-	-	-
94	T88	-	-	-	-
95	T89	-	-	-	-
96	T90	-	-	-	-
97	T91	2.4	2.1	1.3	1.9
98	T92	9	7	7	7.6
99	T93	-	-	-	-
100	T94	-	-	-	-
101	T95	-	-	-	-
102	T96	-	-	-	-
103	T97	-	-	-	-
104	T98	-	-	-	-
105	T99	1.3	1.4	1.1	1.2
106	T100	-	-	-	-
107	T101	-	-	-	-
108	T102	-	-	-	-
109	T103	-	-	-	-
110	T104	-	-	-	-



Şekil 4. 14. Farklı bakteriyel antagonistlerin *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)

Hastalık ile kimyasal mücadelede yetersiz kalınmasından kimyasal mücadeleye alternatif olarak Oksel (2014)'in yaptığı üç farklı yöntemde, *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*' nin farklı dozlarda bitki uçucu yağları kullanılarak patojen popülasyonuna olan antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 21 bitki uçucu yağı kullanılmış ve altı tane uçucu yağ (Bergamut Karabaş, Karanfil, Kekik, Okaliptus, Sarımsak) etkili sonuç vermesi bitki uçucu yağların etkili olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde Bendaoud ve ark. (2009) okaliptüs (*Eucalytus radiata*)'tan elde ettikleri uçucu yağı zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*' ye karşı etkinliklerini denemişlerdir. Okaliptüsten elde edilen ekstraktların antibakteriyel etkilerinin bulunduğunu belirlemişlerdir.

Krid ve ark. (2011) zeytin alt suyu ve bundan elde edilen fenolik ekstraktların *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*'ye karşı *in vitro* ve bitki üzerinde etkinliğini araştırmışlardır. *In vitro* koşullarda hastalık etmeninin gelişimini tamamen durdurduğunu saptamışlardır. Bitki denemelerinde kullandıkları 100, 500 ve 1000 mg L-1 dozlarının sürgünlerde ur oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir.

Trigui ve ark. (2013) kına (*Lawsonia inermis*) yaprak ekstraktını bitki patojeni olan *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*' ye karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test etmişlerdir. Kloroform ve etil asetat ile yapılan yaprak ekstraktlarında hastalık etmenlerinin gelişmesini engellemiştir. Bitki denemelerinde etil asetat ile yapılan yaprak ekstraktlarında farklı konsantrasyonlarda (0.4, 0.2, 0.1 ve 0.05 mg/yara) zeytin dallarında ura neden olan *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*' nin neden olduğu ur oluşumlarını engellenmiştir. Araştırmacılar tarafından hastalığa karşı biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır ve bir çok bitki etkili bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada 110 bitki izolatından 23 tanesinin 1-10.8 mm arasında inhibisyon zonları oluşturarak patojenin çoğalmasını önlemede etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile Bendaoud ve ark. (2009) , Krid ve ark. (2011), Trigui ve ark. (2013) ve Oksel (2014)' ün çalışmaları paralellik göstermektedir. Biyolojik mücadele hastalık etmeni mücadelesinde alternatif bir yöntem olduğu bu çalışma ile de ortaya konmuştur.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Zeytin ağaçlarının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ile enfekteli olması, dal ve sürgünlerde ender olarak da yaprak ve meyvelerde tümör ve gal oluşumu gibi aşırı büyüme ile sonuçlanmaktadır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* zeytin dal kanseri hastalığı, dünya genelinde zeytin ağaçlarının en önemli hastalıklarından bir tanesidir. Hastalığın neden olduğu kayıplar büyük ölçüde coğrafik konum ve zeytin çeşitlerine bağlı olduğu için zararı tahmin etmek zor olsa da, enfekte olmuş ağaçlarda büyüme ve verim orta ve ağır derecede etkilenmekte, ayrıca meyvelerin büyüklüğü ve kalitesi azalmaktadır (Schroth ve ark. 1973; Young 2004, Quesada ve ark. 2010). Patojen toprakta uzun süre canlılığını koruyamaz ve bitkide epifitik ve endofitik olarak yaşamını devam ettirir (Ercolani 1978, Penyalver ve ark. 2006, Quesada ve ark. 2007, Quesada ve ark. 2010). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları fenotipik ve genotipik olarak heterojen olup, geniş bir virülens çeşitliliği sergilemekte ve indükledikleri tümör oluşumları boyut ve şekil olarak çeşitli varyasyonlara sahip olmaktadır (Penyalver ve ark. 2006, Pérez-Martínez ve ark. 2007).

Zeytinlikler bir kez hastalık etmeni ile enfekte olduğunda, patojen bakteriyi bu alanlardan eradike etmek çok zordur. Bu nedenle etmenin kontrolü genellikle önleyici tedbirlere dayanmaktadır. Bununla birlikte, hastalık etmeninin kontrolü için entegre mücadele kapsamında etkili birkaç yöntem olduğu bilinmektedir. Bakır etken maddeli kimyasallar hastalığın mücadelesi için geniş ölçüde kullanılmıştır. Fakat bu bileşiklerin kullanılmasıyla, patojen bakteri bakırlı preparatlara karşı dayanıklılık kazanmış ve bu kimyasalların kullanımı çevreye büyük zararlar vermiştir (Teviotdale ve Krueger 2004, Young, 2004, Quesada ve ark. 2010). Daha önce yapılan biyolojik mücadele çalışmalarıyla *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ile enfekteli zeytin yapraklarından izole edilen bakteriyosin üreten *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* (Lavermicocca ve ark. 2002), *Pseudomonas putida* gibi fluorescent *Pseudomonas* ve *Bacillus subtilis* izolatları ile zeytin dal kanseri hastalığının mücadelesi yapılmıştır (Vlassak ve ark. 1992, Rokni Zadeh ve ark. 2008, Krid ve ark. 2010, Li ve ark. 2011, Krid ve ark. 2012).

Tekirdağ ilinde Şarköy ilçesi Mürefte, Güzelköy, Hoşköy mahallelerinde zeytin bahçelerine çalışma kapsamında, 2016 üretim yılında 11 ve 2017 üretim yılında 4 zeytin bahçesi olmak üzere toplam 15 zeytin bahçesi incelenmiştir. Yapılan surveyler sonucu elde edilen zeytin dal kanseri etmeni 78 adet hastalıklı bitki örneği toplanmış ve 52 adet izolat klasik tanı yöntemleriyle tanılanmıştır. İzolatların tamamı gram negatif, oksidaz, pektolitik aktivite, levan ve arginin dehidrolaz negatif fakat tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonları ve patojenite testi pozitif olmasından dolayı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak tanılanmıştır.

Zeytin çiçek ve yapraklarından elde edilen 50 adet ve topraktan elde edilen 60 adet olmak üzere toplam 110 adet aday antagonist izolatlarına tütün HR testi yapılarak negatif sonuç vermesiyle patojen olmadığı belirlenmiştir.

110 adet aday antagonist izolatları ile *in vitro* koşullarda yapılan bu tez çalışması kapsamında petrilere 3 nokta şeklinde ekilmiş olup üzerine *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarından hazırlanan süspansiyon püskürtme yöntemi ile bulaştırılmıştır. Aday antagonist bakteri izolatlarından zeytin çiçeğinden elde edilen 9, zeytin yaprağından 3, topraktan elde edilen 11 olmak üzere toplam 23 tanesi 1-10.8mm arasında inhibisyon zonları oluşturarak patojenin çoğalmasını önledikleri tespit edilmiştir. Bu gözlemler sonucu patojen bakterinin biyolojik mücadelesi ile umut var sonuçlar olabileceği görülmüştür.

Bakteriyel hastalıklarla mücadelede kimyasal kullanımının mümkün olmaması ve antibiyotik kullanımının ülkemizde yasak olması gibi nedenlerden dolayı, bakteriyel hastalıklarla mücadelede alternatif yöntemlere gerek duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında görülen aday antagonistlerin *in vitro* 'da patojenin gelişimini tamamen engelleyecek kadar etkili sonuçlar vermesi ve antagonistlerin ümit vaat eden mücadele yöntemi olabileceğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında yol gösteren, yardımlarını gördüğüm ve bana “Tekirdağ’ da Zeytin Dal Kanseri Hastalığı Etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ nin Tanısı ve Bakteriye Antagonistlerle Biyolojik Mücadelesi” konulu Yüksek Lisans Tezini veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa MİRİK’ e, çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tez Jüri üyeleri Sayın Dr. Öğr. Üyesi Adnan KARA ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Mustafa KÜSEK yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda buldukları için teşekkür ederim.

Sağladıkları olanaklardan dolayı Bitki Koruma Bölümü Bölüm Başkanlığı’na ve maddi desteklerinden dolayı Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında ve yazım aşamasında bana destek veren Araş. Gör. İrem ALTIN ve Araş. Gör. Cansu ÖKSEL’ e teşekkür ederim.

Destek ve anlayışlarından dolayı Malkara Ziraat Odası’na, teşekkür ederim.

Arazi çıkışlarımda bana yardımcı olan Şarköy Ziraat Odası Ziraat Mühendisi Merve Eren’ e ve Şarköy Marmarabirlik zeytin eksperlerine teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, destek ve sevgilerini hissettiren canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emeği geçen herkese teşekkürler..

KAYNAKLAR

- Anonim, https://www.turkcebilgi.com/zeytin_a%C4%9Fac%C4%B1http://www.organicgroup.eu/?Dizayn=Detay&Id=361
- Akay Z (1996). Zeytinyęi Sektöründe Son Gelişmeler. İzmir Ticaret Borsası Dergisi 7: 25
- Armağan G, Atıcı C, Konak K ve Özden A (2006). Aydın Yöresinde Zeytinyağı İşletmelerinin İhracat ve Ekonomik Performanslarının Belirlenmesi ve İhracata Yönelik Öneriler. Türkiye, 7, 13-15.
- Basim H ve Ersoy A (2000). Batı Akdeniz Bölgesinde Zeytin Ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Tarafından Oluşturulan Bakteriyele Dal Kanseri Hastalığının Yayılışı Ve Hastalık Etmeninin Tanısı. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu 310-315. 6-9.
- Bendaoud H, Bouajila J, Rhouma A, Savagnac A, Romdhane M (2009). GC/MS Analysis and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oil of Eucalyptus Radiata. Society of Chemical Industry, 2.
- Bertolini E, Olmos A, López, M M, and Cambra, M (2003). Multiplex Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction In A Single Tube for Sensitive and Simultaneous Detection of Four RNA Viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* In Olive Trees. Phytopathology, 93(3), 286-292.
- Bozkurt I A, Soylu S, Mirik M, Ulubas Serce C and Baysal Ö (2014). Characterization of Bacterial Knot Disease Caused By *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Trees: A New Host Of The Pathogen. Letters In Applied Microbiology, 59(5), 520-527.
- Bradbury J F (1986) 'Guide To Plant Pathogenic Bacteria.' (Wallingford, UK: CAB International)
- Comai, L. U. C. A., and T. S. U. N. E. Kosuge. "Involvement of Plasmid Deoxyribonucleic Acid in İndoleacetic Acid Synthesis in *Pseudomonas savastanoi*." Journal of Bacteriology 143.2 (1980): 950-957.
- FAO (2016). Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division. Web: <http://bit.ly/26dlhbl> Erişim Tarihi: 12.04.2016.
- Gardan L, David C, Morel M, Glickmann E, Abu-Gorrah M, Petit A and Dessaux Y (1992). Evidence for A Correlation Between Auxin Production and Host Plant Species Among Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 1780-1783.
- Gemas, V. J. V, Almadanım M. C, Tenreiro R, Martins A, and Fevereiro P (2004). Genetic Diversity in the Olive Tree (*Olea Europaea* L. subsp. *europaea*) Cultivated In Portugal Revealed by RAPD and ISSR Markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 51(5), 501-511.
- Ghanney N, Iacobellis N, Belhouchette K, Nahdı S and Ferchıchia A (2016). Preliminary investigation on the Olive knot disease (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) in

the Tunisian southeast. Evaluation des réformes agraires issues du projet de conservation des eaux et des sols et leurs implications directes sur l'activité de l'élevage dans une zone aride tunisienne: Oued Soukra–El Hamma (MA BOUZAIDA, 39, 109.

- Hall B H, Cother E J, Whattam M, Noble D, Luck, J, And Cartwright D (2004). First Report of Olive Knot Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on Olives (*Olea Europaea*) In Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(3), 433-436.
- Iacobellis, NS, Sisto, A, Surico, G (1993) Occurrence of Unusual Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on Olive in Central Italy *epiphyta* Bulletin 23429435
- Iacobellis, N S, A Caponero, and A Evidente (1998). "Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* Strains Isolated From Ash." *Plant Pathology* 47.1, 73-83.
- Iacobellis N S (2001) Olive Knot. In 'Encyclopaedia of Plant Pathology'. Vol. 2. (Eds OC Malloy, TD Murray) Pp. 713–715. (John Wiley and Sons)
- IOC (2016). Inter National Olive Council, Survey and Assessment Division. Web: <http://bit.ly/1vfdjld>
- Janse, J D (1982). "*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (Ex Smith) Subsp. Nov., Nom. Rev., The Bacterium Causing Excrescences on *oleaceae* and *nerium oleander* L." *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology* 32.2 ,166-169.
- Janse J D (1981). The Bacterial Disease of Ash (*Fraxinus Excelsior*) Caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology And Taxonomic Considerations. *Eur. J. For. Pathol.*, 11: 425-438.
- Kacem M, Fadhila K, Chahinez, M, Meriem R, Philippe, D. L and Abdelkader B (2009). Antimicrobial activities of Rhizobium sp. strains against *Pseudomonas savastanoi*, the agent responsible for the olive knot disease in Algeria. *Grasas y aceites*, 60(2), 139-146.
- Klement Z, Goodman R N (1967). The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 5: 17-44.
- Krid S, Triki, M A, Gargouri, A and Rhouma A (2012). Biocontrol of Olive Knot Disease by *Bacillus subtilis* Isolated From Olive Leaves. *Annals of Microbiology*, 62(1), 149-154.
- Krid S, Bouaziz M, Triki M A, Gargouri A, Rhouma A (2011). Inhibition of Olive Knot Disease By Polyphenols Extracted From Olive Mill Waste Water. *Journal of Pathology.*, 93(3):561-568.
- Krid S, Rhouma A, Quesada J M, Penyalver R, and Gargouri A (2009). Delineation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strains Isolated in Tunisia by Random-Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 886-894.

- Lavermicocca P, Lonigro S L, Valerio F, Evidente A and Visconti A (2002). Reduction of Olive Knot Disease by a Bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. Applied and Environmental Microbiology, 68(3), 1403-1407.
- Maldonado-González M M, Prieto P, Ramos C And Mercado-Blanco J (2013). From the Root to the Stem: Interaction Between the Biocontrol Root Endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and The Pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in Olive Knots. Microbial Biotechnology, 6(3), 275-287.
- Marchi G, Mori B, Pollacci, P, Mencuccini M and Surico G (2009). Systemic Spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Explants. Plant Pathology, Vol. 58, No. 1, (February 2009), Pp. 152-158, ISSN 0032-0862
- Mirik M, Aysan Y, Büyükyılmaz M (2007). Türkiye' nin Marmara Bölgesi Zeytin Üretim Alanlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Yaygınlığı Üzerine Araştırmalar. II Bitki Koruma Kongresi, Isparta.
- Mirik M ve Aysan Y (2008). "Zeytin Dal Kanseri (Bacterial Knot Disease) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*." 113-114.
- Mirik M (2011). Marmara Bölgesinde Zeytin Dal Kanseri Hastalığının Yaygınlığı ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 17(4).
- Ozden F (2006). Turkey's Olive Oil Foreign Trade, Implementing Policies, Encountered Problems and Suggestions. Ege University, Izmir-Turkey. P. 144 (M.S. Thesis). (Tr).
- Öksel C (2014). Zeytin Dal Kanseri Etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye Karşı in Vitro Koşullarda Farklı Bitkilerin Uçucu Yağlarının Etkisi (Master's Thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Özkaya M T, Tunalıoğlu R, Eken Ş, Ulaş M, Tan M, Danacı A ve Tibet Ü (2010). Türkiye Zeytinciliğinin Sorunları ve Çözüm Önerileri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15.
- Öztürk, Fatma, Mine Yalçın ve H. Dıraman (2009). "Türkiye Zeytinyağı Ekonomisine Genel Bir Bakış." *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 4.2, 35-51.
- Penyalver, R, García, A, Ferrer, A, Bertolini, E, Quesada, J.M, Salcedo, C.I, Piquer, J, Pérez-Panadés, J, Carbonell, E.A, Del Río, C, Caballero, J.M, And López, M M (2006). Factors Affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Plant Inoculations and Their Use for Evaluation of Olive Cultivar Susceptibility. *Phytopathology*, Vol. 96, No. 3, (March 2006), Pp. 313-319, ISSN 0031-949X
- Rodríguez-Moreno, L, Barceló-Muñoz, A, And Ramos, C. (2008). In Vitro Analysis of The Interaction of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Nerii* With Micropropagated Olive Plants. *Phytopathology*, 98(7), 815-822.
- Rodríguez-Palenzuela P, Matas I M, Murillo J, López-Solanilla E, Bardaji L, Pérez Martínez I, Rodríguez-Mosquera M E, Penyalver R, López M M, Quesada J M, Biehl B S, Perna N T, Glasner J D, Cabot E L, Neeno-Eckwall E and Ramos C (2010). Annotation and Overview of The *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 Draft Genome Reveals the Virulence Gene Complement of A Tumourinducing Pathogen of Woody Hosts. *Environmental Microbiology*, Vol. 12, No. 6, (June 2010), Pp. 1604-1620, ISSN 1462 2920.

- Rokni Zadeh, H, Khavazi, K, Asgharzadeh, A, Hosseini-Mazinani M and De Mot R (2008). Biocontrol of *Pseudomonas savastanoi*, Causative Agent of Olive Knot Disease: Antagonistic Potential of Non-Pathogenic Rhizosphere Isolates of Fluorescent *Pseudomonas*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 73(1), 199-203.
- Schroth M N, and Hildebrand D C (1968). A Chemotherapeutic Treatment for Selectively Eradicating Crown Gall and Olive Knot Neoplasms. Phytopathology, 58(6), 848
- Seçer A ve Emeksiz F (2012). Doğu Akdeniz Bölgesi 'Nde Zeytin ve Zeytinyağı Üretimi. Pazarlaması ve Bölgede Zeytinciliği Geliştirme Olanakları, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü.
- Servi D ve Baştaş K K (2012). Aydın İli'nde Zeytin Bakteriyel Dal Kanseri Hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)'nın Tespiti ve Tanılanması. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 26(3), 1-8.
- Shoda, Makoto (2000). "Bacterial Control of Plant Diseases." *Journal Of Bioscience and Bioengineering* 89.6. 515-521.
- Smith E F (1908). Recent Studies on the Olive-Tubercle Organism. U.S. Dept. Agr. Bur. Plant Indust. Bull. No. 131 Part, IV.
- Smith D D (1978). Predicting Rainfall Erosion Losses. A Guide to Conservation Planning. Agriculture Handbook No. 537. USDA, Washington DC
- Sisto A, Morea M, Zaccaro F, Palumbo G, Iacobellis N S (1999). Isolation and Characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Mutants Defective in Hypersensitive Response Elicitation And Pathogenicity. Journal Phytopathology, 145- 147.
- Surico G and Lavermicocca P (1989). A Semiselective Medium For The Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Phytopathology 79: 185-190
- Tatlı B ve Benlioğlu K (2004). Aydın ve Muğla İllerinde Zeytin Ağacı Uru *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Hastalığı Üzerine Çalışmalar T.C. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı , 62 S.
- Teviotdale BL (1994). Diseases of Olive, in 'Olive Production Manual'. (Eds L Ferguson, GS Sibbett, GC Martin) P. 107. University of California Publication No. 3353.
- Tezcan H (2000). Bursa İli Zeytin Alanlarında *Spilocaea Oleagina* (Cast.) Hughes' İn Neden Olduğu Yaprak Lekesi Hastalığı Üzerinde Ön Çalışmalar. *Türkiye, 1*, 6-9.
- Trigui M, Hsouna A B, Hammami I, Culioli G, Ksantini M, Tounsi S, Jaoua S (2013). Efficacy of Lawsonia İnermiş Leaves Extract and Its Phenolic Compounds Against Olive Knot And Crown Gall Diseases. Crop Protection, 45:83-88.
- Türkmenoğlu Z (1965). Zeytin Dal Kanseri, *Pseudomonas savastanoi* (Smith) Stevens Üzerinde Antibiotik İhtiva Eden Preparatlarla Yapılan Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 5(3).
- Türkiye Sanayi Sevk ve İdare Enstitüsü (TÜSSİDE) (2015). Zeytin ve Zeytinyağı Sektörü Ulusal Kümelenme Stratejisi Raporu, Kocaeli: Türkiye Sanayi Sevk ve İdare Enstitüsü.
- TÜİK (2015). www.tuik.gov.tr. Türkiye Zeytin Üretimi.

- Üstün N, Mete N, Arslan N, Karataş A, Özaktan H, Türkölmez Ş (2010). Bazı Zeytin Çeşitlerinin Zeytin Dal Kanseri Hastalığı Etmen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye Karşı Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi, TAGEM.
- Quesada, J.M, García, A, Bertolini, E, López, M M and Penyalver, R. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* From Symptomless Shoots of Naturally Infected Olive Trees. International Microbiology, Vol. 10, No. 2, (June 2007), Pp. 77-84, ISSN 1139-6709 Whipps, John M. "Microbial Interactions and Biocontrol in the Rhizosphere." Journal of Experimental Botany 52.Suppl_1 (2001): 487-511.
- Quesada J M, Penyalver R, Pérez-Panadés J, Salcedo C I, Carbonell E A, and López, M M (2010). Comparison of Chemical Treatments for Reducing Epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Populations and for Improving Subsequent Control of Olive Knot Disease. Crop Protection, Vol. 29, No. 12, (December 2010), Pp. 1413-1420, ISSN 0261-2194
- Wilson E E (1965). Pathological Histogenesis in Oleander Tumors Induced by *Pseudomonas savastanoi*. Phytopathology 55: 1244-1249
- Yolageldi, L, Tunç C, Onoğur E ve Yıldırım I (2001). Batı Anadolu'da Zeytin *verticillium* Solgunluğunun Yaygınlığı, Yakalanma Oranı, Hastalık Şiddeti Ve Hastalık Çıkışında Etkili Bazı Faktörler Üzerinde Araştırmalar. In IX. Th Turkish Phytopathology Congress (Pp. 299-305).
- Young J M, Dye D W, Bradbury J F, Panagopoulos C G and Robbs C F (1978). A Proposed and Classification for Plant Pathogenic Bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research 21: 153-177
- Young, J M (2004). Olive Knot and its Pathogens. Australasian Plant Pathology, 33(1), 33-39.

EKLER

EK 1. King B Besi Yeri (King ve ark 1954)

Proteose Peptone 20.0g

Gliserin 10.0ml

K₂HPO₄ 1.5g

MgSO₄·7H₂O 1.5g

Agar 15.0g

Distile Su 1000ml

121 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 2. Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat (YDC) Agar (Lelliott ve Stead, 1987)

Yeast Extract 10.0g

Dextrose 20.0g

Calcium Carbonate 20.0g

Agar 15.0g

Distile Su 1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 3. Nutrient Broth Sıvı Besi Yeri (Lelliott ve Stead 1987)

Nutrient broth 8g

Distile Su 1000ml

121 °C' de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 4. Nutrient Agar (NA) Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

Nutrient Agar 13.0g

Distile Su 1000ml

121 °C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 5. Vaspar

1 ölçü vazelin

3 ölçü sıvı parafin, 121 °C 15 dakika otoklav edilir.

EK 6. NBRIP (National Botanical Research Institute’ phosphate growth medium) Besi Yeri (Nautiyal, 1999)

Glukoz 20.0g

Ca₃(PO₄)₂ 10.0g

(NH₄)SO₄ 0.1g

MgSO₄-7/H₂O 0.25g

KCl 0.2g

MgCl₂ 6H₂O 5.0g

Bromphenoleblue (BPB) 0.025g

Saf su 1000ml 121 °C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Tekirdağ Malkara' da doğdu. Liseyi Edirne' de bitirdi. 2015 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'nin Bitki Koruma Bölümü'nden mezun oldu. 2016' da Namık Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Ana Bilimdalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Ekim 2016' da Malkara Ziraat Odası' nda Tarım Danışmanı olarak çalışmaya başladı ve halen devam etmektedir.